

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Tereza Jančušková

Využití nových molekulárních technologií v identifikaci unikátních klonálních markerů pro monitorování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií

The use of novel technologies in the identification of unique molecular markers for minimal residual disease assessment in acute leukemia patients

Dizertační práce

Vedoucí práce: MUDr. Soňa Peková, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne

.....
Tereza Jančušková

Identifikační záznam

JANČUŠKOVÁ, Tereza. *Využití nových molekulárních technologií v identifikaci unikátních klonálních markerů pro monitorování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií. [The use of novel technologies in the identification of unique molecular markers for minimal residual disease assessment in acute leukemia patients]*. Praha, 2015. 91 stran, 4 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, laboratoř synlab genetics s.r.o., vedoucí závěrečné práce Peková, Soňa.

Klíčová slova: Akutní leukémie, chromozomová mikrodisekce, molekulární marker, minimální reziduální nemoc, personalizovaná medicína

Keywords: Acute leukemia, chromosome microdissection, molecular marker, minimal residual disease, personalized medicine

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat zejména své školitelce MUDr. Soně Pekové, Ph.D., a to nejen za odborné vedení práce, přátelský přístup, cenné rady a nekonečný optimismus, ale především za přijetí do kolektivu a poskytnutí možnosti vypracovat dizertační práci na profesionálním pracovišti laboratoře synlab genetics s.r.o.

Poděkování patří také všem kolegyním a kolegům z laboratoře za vynikající pracovní atmosféru a neocenitelnou zpětnou vazbu.

Práce byla podpořena grantem MPO ČR (FR-TI2/579) - Identifikace nových genetických markerů pro sledování minimální reziduální choroby u akutních leukémií.

Abstrakt

Akutní leukémie (AL) představují heterogenní skupinu maligních onemocnění krvetvorby s různou prognózou. Díky této různorodosti AL nelze s jistotou predikovat odpověď pacienta na léčbu. Proto je velmi důležité sledovat množství zbytkové maligní populace buněk po léčbě, tzv. minimální reziduální nemoc (MRN). K detekci MRN se běžně využívají přestavby těžkého řetězce imunoglobulinu nebo genů pro T-buněčný receptor, rekurentní cytogenetické abnormality a mutace v hematologicky významných genech. Zatímco u naprosté většiny dospělých pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií je pomocí rutinního screeningu identifikován cíl pro sledování MRN, u dospělých pacientů s akutní myeloidní leukémií nalézáme vhodný cíl pouze u poloviny případů. Z tohoto důvodu je velmi žádoucí identifikovat nové specifické markery leukemických blastů, které budou sloužit ke sledování MRN u pacientů, u nichž nebyla nalezena žádná ze standardně vyšetřovaných aberací.

Cílem dizertační práce bylo vyvinout novou flexibilní strategii pro mapování zlomů aberovaných chromozomů na nukleotidovou úroveň a navrhnout klonálně specifický PCR test pro sledování MRN u pacientů s AL (resp. s AML).

Kombinací cytogenetických (pruhování chromozomů, mikrodisekce chromozomů), molekulárně-cytogenetických (mFISH, mBAND) a molekulárně-biologických (sekvenování DNA, long-range PCR, real-time PCR) metod jsme v karyotypu pacientů s AL identifikovali unikátní chromozomové aberace a charakterizovali nukleotidové sekvence zlomových míst těchto aberací. Finálním produktem je molekulární test pro real-time PCR, který umožnil senzitivně sledovat MRN.

S použitím výše uvedených technik jsme zamapovali chromozomové zlomy u 5 pacientů s diagnózou AL. Příprava testu pro real-time PCR poté umožnila sledovat a kvantifikovat populaci buněk nesoucích chromozomovou aberaci identifikovanou v záchytu onemocnění. Srovnání nově vytvořeného testu se standardním testem využívaným v rutinní praxi ukazuje, že popsáním postupem nalezené molekulární markery mohou být využity ke sledování MRN u pacientů s AL.

Zde popsáný přístup otevírá nové možnosti charakterizace unikátních chromozomových zlomů. Předložená práce jasně ukazuje, že mapování chromozomových aberací až na úroveň nukleotidů je pro vybrané pacienty s AL realizovatelné a vhodné pro standardní klinickou praxi.

Abstract

Acute leukemias (AL) comprise a heterogeneous group of hematologic malignancies, and individual patient responses to treatment can be difficult to predict. Monitoring of minimal residual disease (MRD) is thus very important and holds great potential for improving treatment strategies. Common MRD targets include immunoglobulin heavy chain or T-cell receptor gene rearrangements, recurrent cytogenetic abnormalities and mutations in important hematological genes. Whereas in the majority of adult acute lymphoblastic leukemia patients a suitable MRD target can be identified, in adult acute myeloid leukemia patients well-characterized targets are found in only half of cases. The identification of new specific molecular markers of leukemic blasts for MRD assessment, particularly in AML patients, is therefore highly desirable.

Our aim was to develop a flexible strategy for mapping of cytogenetically identified unique clone-specific abnormalities down to the single nucleotide level and, based on the sequence, design a specific real-time PCR assay for MRD assessment in AL patients without any previously described MRD marker.

Using a combination of cytogenetic (chromosome banding, chromosome microdissection), molecular cytogenetic (mFISH, mBAND) and molecular biological (next-generation sequencing, long-range PCR, Sanger sequencing, real-time PCR) techniques we were able to characterize the DNA sequence flanking unique chromosomal breakpoints. Finally, we designed a specific real-time PCR assays for sensitive MRD monitoring in AL patients.

With the use of above mentioned techniques, we mapped derivative chromosomes in 5 AL patients and performed real-time PCR quantification of unique MRD markers for each patient. A comparison of these newly-designed assays to a standard assay used in clinical practice shows that our technical approach is suitable for the identification of novel molecular MRD markers in AL patients.

Our work shows that rapidly moving from the chromosomal level to the nucleotide level is feasible, opening new vistas in the characterization of unique chromosomal breakpoints as well as providing new MRD markers for eligible AL patients.

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Obsah	7
Seznam obrázků.....	9
Seznam tabulek.....	10
Seznam použitých zkratk	11
Úvod.....	14
1 Literární přehled	15
1.1 Akutní myeloidní leukémie (AML)	15
1.1.1 Cytogenetické aberace u AML	19
1.1.2 Genové mutace u AML.....	22
1.1.3 Zvýšená genová exprese	24
1.2 Akutní lymfoblastická leukémie (ALL).....	26
1.2.1 Cytogenetické aberace u ALL	27
1.2.2 Přestavby genů pro IgH a TCR.....	28
1.3 Minimální reziduální nemoc (MRN)	29
1.3.1 Detekce MRN pomocí PCR.....	30
1.3.2 Detekce MRN pomocí průtokové cytometrie	33
2 Cíle práce	35
3 Materiál a metodika	36
3.1 Analyzované vzorky.....	36
3.2 Zpracování vzorků	36
3.2.1 Izolace nukleových kyselin a reverzní transkripce	36
3.2.2 Detekce fúzních transkriptů a genových mutací.....	37
3.2.3 Kultivace buněk	37
3.2.4 Klasická cytogenetická analýza	38

3.2.5	Molekulárně-cytogenetické analýzy	38
3.2.6	Chromozomová mikrodisekce	40
3.2.7	DOP-PCR.....	41
3.2.8	Sekvenování nové generace (NGS, Next-Generation Sequencing).....	41
3.2.9	Long-range PCR	41
3.2.10	Sekvenování DNA - Sangerova metoda	42
3.2.11	Test pro real-time PCR	42
3.2.12	Počítačový program BreakLoc	42
3.3	Obecný postup.....	43
4	Výsledky	46
4.1	Buněčná linie K562	46
4.2	Pacienti s AL	47
5	Diskuze	67
6	Závěr	75
7	Citovaná literatura.....	76
8	Přílohy.....	92

Seznam obrázků

Obrázek 3.1: Schémata použitých kitů pro mBAND analýzu.	39
Obrázek 3.2: Schéma lokus-specifických sond.	40
Obrázek 3.3: Schématické zobrazení postupu při návrhu primerů pro long-range PCR.	44
Obrázek 3.4: Hlavní kroky k identifikaci nukleotidové sekvence chromozomových zlomů	45
Obrázek 4.1: Molekulárně-cytogenetická analýza buněčné linie K562.	46
Obrázek 4.2: Buněčná linie K562. Nukleotidová sekvence chromozomového zlomu. .	47
Obrázek 4.3: Pacient 1. Analýza karyotypu.	49
Obrázek 4.4: Pacient 1. FISH s lokus-specifickou sondou pro gen <i>KMT2A</i>	50
Obrázek 4.5: Pacient 1. Reverzní FISH.	51
Obrázek 4.6: Pacient 1. Nukleotidová sekvence zlomů derivovaných chromozomů.	52
Obrázek 4.7: Pacient 1. Kvantifikační grafy.	52
Obrázek 4.8: Pacient 2. Analýza karyotypu.	54
Obrázek 4.9: Pacient 2. FISH s lokus-specifickou sondou pro gen <i>KMT2A</i>	55
Obrázek 4.10: Pacient 2. Nukleotidová sekvence chromozomového zlomu.	55
Obrázek 4.11: Pacient 2. Kvantifikační graf.	55
Obrázek 4.12: Pacient 3. Analýza karyotypu.	57
Obrázek 4.13: Pacient 3. Nukleotidová sekvence chromozomového zlomu.	58
Obrázek 4.14: Pacient 3. Kvantifikační graf.	58
Obrázek 4.15: Pacient 4. Analýza karyotypu.	59
Obrázek 4.16: Pacient 4. FISH s lokus-specifickou sondou pro gen <i>MECOM</i>	60
Obrázek 4.17: Pacient 4. Nukleotidová sekvence chromozomového zlomu.	60
Obrázek 4.18: Pacient 4. Kvantifikační graf.	60
Obrázek 4.19: Pacient 5. Analýza karyotypu.	61
Obrázek 4.20: Pacient 5. FISH s lokus-specifickou sondou pro gen <i>MECOM</i>	62
Obrázek 4.21: Pacient 5. Nukleotidová sekvence chromozomového zlomu.	62
Obrázek 4.22: Pacient 5. Kvantifikační graf.	62
Obrázek 4.23: Pacient 6. Analýza karyotypu.	64
Obrázek 4.24: Pokrytí chromozomu 9 referenčními sekvencemi.	65
Obrázek 4.25: Pacient 7. Analýza karyotypu.	66

Seznam tabulek

Tabulka 1.1: Klasifikace AML dle FAB.	17
Tabulka 1.2: Klasifikace AML dle WHO.....	18
Tabulka 1.3: Prognostický význam chromozomových aberací u AML.	19
Tabulka 1.4: Klasifikace ALL dle FAB.....	27
Tabulka 1.5: Klasifikace ALL dle WHO.....	27
Tabulka 1.6: Metody vyšetřování MRN.	30
Tabulka 1.7: AcutePlexX CE.....	32
Tabulka 4.1: Přehled výsledků cytogenetických, molekulárně-cytogenetických a molekulárně-biologických vyšetření všech pacientů.	48
Tabulka 4.2: Základní informace o mikrodisekci a sekvenaci disekovaného materiálu.	50

Seznam použitých zkratk

A	Adenin
ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AFF1	AF4/FMR2 family, member 1
AL	Akutní leukémie
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukémie
ATRA	All-trans retinová kyselina
BAALC	Brain and acute leukemia, cytoplasmic
BAC	Bacterial artificial chromosome
BCOR	BCL6 (B-cell CLL/lymphoma 6) corepressor
BCR	Breakpoint cluster region
BHQ-1	Black hole quencher-1
bp	Base pair (pár bází DNA)
C	Cytosin
CBFB	Core-binding factor, beta subunit
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Complementary DNA
CEBPA	CCAAT enhancer-binding protein alpha
del	Delece
der	Derivovaný chromozom
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha
DOP-PCR	Degenerate oligonucleotide-primed PCR
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ERG	ETS (erythroblast transformation-specific) - related gene
ETO	Eight-twenty-one
ETV6	ETS variant 6
EVI1	Ecotropic virus integration site 1
FAB	French-American-British
FAM	6-carboxyfluorescein

FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FLT3	Fms-related tyrosine kinase 3
G	Guanin
G1	Gap 1 (fáze buněčného cyklu)
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial
IgH	Immunoglobulin heavy locus
ins	Inzerce
inv	Inverze
ISCN	International system for human cytogenetic nomenclature
ITD	Internal tandem duplication
kbp	Kilobase pair
KMT2A	Lysine (K)-specific methyltransferase 2A
mBAND	Mnohobarevné pruhování s vysokou rozlišovací schopností
Mbp	Megabase pair
MCB	Multicolor Chromosome Banding
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus
mFISH	Mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
MLL	Myeloid/lymphoid Leukemia
MLLT10	Myeloid/lymphoid Leukemia; translocated to, 10
MN1	Meningioma (disrupted in balanced translocation) 1
MRN	Minimální reziduální nemoc
MYH11	Myosin, heavy chain 11
NGS	Next-generation sequencing
NPM1	Nucleophosmin 1
p	Označení pro krátké rameno chromozomu (z fr. „petit“)
PCR	Polymerase chain reaction
PML	Promyelocytic leukemia
PTD	Parciální tandemová duplikace
q	Označení pro dlouhé rameno chromozomu
RARA	Retinoic acid receptor, alpha
RB1	Retinoblastoma 1
RNA	Ribonukleová kyselina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RUNX1	Runt-related transcription factor 1
RUNX1T1	Runt-related transcription factor 1; translocated to, 1
S	Syntetická fáze buněčného cyklu
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Saline sodium citrate
T	Thymin
t	Translokace
TCR	T-cell receptor
TET2	Tet methylcytosine dioxygenase 2
TP53	Tumor protein 53
WHO	World Health Organization
WT1	Wilms tumor 1

Úvod

Akutní leukémie (AL) patří mezi závažná hematologická onemocnění s různou prognózou, která závisí na včasné a správné diagnostice, vhodné léčbě a v neposlední řadě na genetickém pozadí daného jedince. Díky velké biologické rozmanitosti AL nelze zcela predikovat odpověď pacienta na léčbu. Proto je nutné využívat laboratorních technik, které pomocí klonálně specifických znaků umožní správně diagnostikovat a stratifikovat pacienty s AL a současně sledovat množství zbytkové maligní populace buněk po léčbě, tzv. minimální reziduální nemoc (MRN). Vedle morfologického vyšetření kostní dřeně, imunofenotypizace blastů a cytogenetického (příp. molekulárně-cytogenetického) vyšetření patří mezi tyto techniky především PCR, která se díky vysoké senzitivitě i specifitě stala nezbytnou součástí diagnostického panelu pro pacienty s AL. Uvedená vyšetření mají také přínosný prognostický význam.

Jako MRN jsou označovány maligní buňky, které setrvávají v organismu i po dosažení kompletní hematologické remise a nejsou detekovatelné cytologickými metodami. Principem sledování MRN je identifikace klonálního markeru leukemické buňky, který je detekován pomocí vysoce senzitivních technik založených na real-time PCR. Pomocí tohoto markeru můžeme sledovat dynamiku maligní populace buněk v odpovědi na léčbu pacienta. Vhodný cíl pro sledování MRN je rutinními technikami identifikován u většiny dospělých pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a pouze u poloviny případů s akutní myeloidní leukémií (AML). Z tohoto důvodu je, zejména u pacientů s AML, žádoucí identifikovat nové specifické markery leukemických blastů, které umožní sledování MRN i u pacientů, u nichž nebyla nalezena žádná ze standardně vyšetřovaných aberací. Informace o MRN je pro klinického lékaře velmi důležitá, jelikož umožňuje predikovat selhání léčebné odpovědi, případně dovoluje včas předpovědět blížící se relaps onemocnění. Dále je zásadní sledovat hladinu MRN před transplantací hematopoetických kmenových buněk.

Cílem této dizertační práce bylo vyvinout zcela jedinečný přístup, který umožní nejen detekovat, ale také charakterizovat zlomová místa unikátních chromozomových aberací až na úroveň jednotlivých nukleotidů. Takto získaná sekvence DNA poté slouží k přípravě specifického testu pro real-time PCR, díky kterému můžeme s vysokou senzitivitou hodnotit individuální odpověď pacienta na léčbu.

1 Literární přehled

Akutní leukémie patří do skupiny zhoubných onemocnění krvetvorby vycházejících z krvetvorné kmenové buňky. Vyznačují se nekontrolovanou proliferací leukemických blastů v kostní dřeni. Dle příslušnosti blastů k myeloidní či lymfoidní linii lze akutní leukémie rozdělit na dvě základní skupiny: jedná se o AML, jejíž buňky odpovídají vývojovým stádiím myeloidní hematopoetické řady a ALL, jejíž buňky nesou znaky lymfoidní linie. AML tvoří přibližně 80 % všech akutních leukémií dospělých, ALL tvoří zbylých 20 %. Podrobnější klasifikace je založena na hodnocení imunofenotypu, cytogenetických změn a molekulárně biologického profilu blastů.

1.1 Akutní myeloidní leukémie (AML)

Akutní myeloidní leukémie je maligní klonální onemocnění hematopoetické tkáně, pro něž je charakteristická proliferace a akumulace nezralých myeloidních prekurzorů v kostní dřeni a jejich vyplavování do periferní krve. Pro stanovení diagnózy AML je typická přítomnost nezralých buněk krvetvorby (myeloblastů), které tvoří > 20 % jaderných buněk v kostní dřeni. Proliferace blastů, která za fyziologických podmínek podléhá regulačním mechanismům, se v případě AML této regulaci vymyká. Důsledkem je rychle se zvyšující počet leukemických blastů v kostní dřeni, který utlačuje fyziologickou krvetvorbu, a tedy rychlý pokles počtu všech zdravých krvinek v periferní krvi. Klinické příznaky jsou způsobeny převážně nedostatkem funkčních krvinek v cirkulaci. U nemocných se často objevuje malátnost, únava a pocit vyčerpání, dále krvácivé a případně infekční komplikace. Mezi symptomy patří horečka, ztráta hmotnosti, nechutenství, chudokrevnost nebo bolesti hlavy. Onemocnění má prudký nástup a stav pacienta se rychle zhoršuje. Průměrná incidence výskytu AML v Evropě činí 2 – 4 nové případy na 100 000 obyvatel za rok (Adam *et al.* 2008). Výskyt onemocnění stoupá s věkem, u starších dospělých (nad 65 let) představuje až 15 případů na 100 000 obyvatel za rok. Etiologie AML není zcela objasněna, existují však některá rizika spojená s vyšší incidencí vzniku onemocnění. Patří mezi ně zejména ionizující záření a chemické látky (alkylační cytostatika, benzen, organické rozpouštědla, herbicidy, pesticidy). Zvýšené riziko vzniku AML je spojeno s některými vrozenými dědičnými poruchami (např. Downův syndrom, Bloomův syndrom, Fanconiho anémie, ataxia telangiectasia).

K základním diagnostickým analýzám patří vyšetření krevního obrazu s mikroskopicky hodnoceným diferenciálním krevním rozpočtem. Obvykle je přítomna leukocytóza výjimečně přesahující $100 \times 10^9/l$, počet leukocytů však může být normální nebo i snížený. V diferenciálním krevním obraze je snížen výskyt zralých granulocytů a jejich vývojová stádia (myelocyty a metamyelocyty) nejsou přítomna, tzv. *hiatus leucaemicus*. Definitivní diagnóza AML je zjistitelná cytologickým vyšetřením kostní dřeně získané sternální punkcí. Aspirovaná kostní dřeň je použita nejen na klasické cytologické vyšetření, ale také na další vyšetření vedoucí k upřesnění diagnózy a prognózy (cytogenetické, molekulárně-biologické, imunofenotypizační vyšetření).

AML je velmi heterogenní onemocnění s řadou subtypů. V praxi se paralelně používají dva klasifikační systémy. První představuje konsenzus francouzských, amerických a britských odborníků z roku 1976 (FAB = French-American-British cooperative group) (Bennett *et al.* 1976) a je založen na morfologickém a cytochemickém hodnocení blastů. FAB klasifikace definuje podskupiny M0 – M7 (Tabulka 1.1). Druhá, novější klasifikace světové zdravotnické organizace (WHO) vychází nejen z morfologických, ale zahrnuje také cytogenetické charakteristiky blastů a lépe zohledňuje heterogenní charakter AML (Sabattini *et al.* 2010; Abdul-Hamid 2011) – Tabulka 1.2.

FAB subtyp	Název	Charakteristika
M0	Nediferencovaná AML	Velké blasty s nápadnými jádérky, cytochemicky negativní
M1	AML bez vyzrávání	Blasty s kulatým jádrem a menším množstvím cytoplazmy, s ojedinělými azurofilními granuly a Auerovými tyčemi, myeloperoxidáza a Sudanová čern pozitivní
M2	AML s vyzráváním	Blasty s četným azurofilními granuly a Auerovými tyčemi, myeloperoxidáza a Sudanová čern pozitivní; častá t(8;21)(q22;q22)
M3	Akutní promyelocytární leukémie	Blasty s kulatým jádrem a jádérky, hojné Auerovy tyče a granula, myeloperoxidáza a Sudanová čern silně pozitivní; častá t(15;17)(q24;q21)
M4	Akutní myelomonocytární leukémie	Blasty se světle šedou, granulovanou cytoplazmou a zprohýbanými jádry, pozitivní nespecifické esterázy
M4eo	Akutní myelomonocytární leukémie s eozinofilií	Blasty vzhledu myelomonocytární leukémie, eozinofily tvoří 5-10 % buněk dřeně; časté abnormality 16q22
M5	Akutní monocytární leukémie	Blasty se zprohýbanými jádry a hojnou, lehce granulovanou cytoplazmou s Auerovými tyčemi; časté abnormality 11q23
M6	Akutní erytroblastická leukémie	Bizarní erytroblasty, často mnohojaderné
M7	Akutní megakaryocytární leukémie	Mikromegakaryocyty jedno či dvoujaderné, kyselá fosfatáza pozitivní; častá inv(3)(q21q26)

Tabulka 1.1: Klasifikace AML dle FAB.
Bennett *et al.* 1976

„World Health Organization“ (WHO) klasifikace AML	
I. AML s rekurentními genetickými abnormalitami	
AML s t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	
AML s inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	
AML s t(15;17)(q24;q21); <i>PML-RARA</i> a variantní fúze	
AML s 11q23 (<i>KMT2A</i>) abnormalitami	
AML s t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>	
AML s inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26); <i>RPN1-EVII</i>	
AML s mutací genu <i>NPM1</i>	
AML s mutací v genu <i>CEBPA</i>	
II. AML s dysplazií více buněčných linií	
Následující myelodysplastický syndrom	
Bez předchozího myelodysplastického syndromu	
III. AML související s předchozí léčbou	
Související s léčbou alkylačními cytostatiky	
Související s léčbou inhibitory topoizomerázy II	
Jiné typy	
IV. AML jinak nekategorizované	
AML minimálně diferencovaná	
AML bez maturace	
AML s maturací	
Akutní myelomonocytární leukémie	
Akutní monoblastická a monocytická leukémie	
Akutní erytroidní leukémie	
Akutní megakaryocytární leukémie	
Akutní bazofilní leukémie	
Akutní panmyelóza s myelofibrózou	
V. Myeloidní sarkom	
VI. Akutní myeloidní proliferace u Downova syndromu	
VII. Akutní leukémie nejasných linií	
Nediferencovaná akutní leukémie	
Bilineární akutní leukémie	
Bifenotypická akutní leukémie	

Tabulka 1.2: Klasifikace AML dle WHO.
Abdul-Hamid 2011

1.1.1 Cytogenetické aberace u AML

Nedílnou součástí vyšetření při záchytu onemocnění je cytogenetická analýza buněk kostní dřeně (příp. periferní krve), která umožňuje nejen zpřesnění diagnózy a určení stádia nemoci, ale je také důležitým nezávislým prognostickým ukazatelem. Podle karyotypu leukemických buněk lze nemocné zařadit do tří prognostických skupin: s příznivou, střední či nepříznivou prognózou (Tabulka 1.3). Abnormality karyotypu u *de novo* zjištěných AML jsou prokazatelné přibližně u 50 - 60 % dospělých pacientů (Mrózek *et al.* 2004; Gregory *et al.* 2009; Bacher *et al.* 2009) a obvykle jsou reprezentovány chromozomovými translokacemi, monozomií, resp. delecí chromozomů 5 či 7 a trizomií chromozomu 8 (Vardimar *et al.* 2009; Martens *et al.* 2010). Komplexní změny karyotypu (tři a více chromozomových abnormalit) se vyskytují u 10 - 15 % případů. Nejčastěji bývají jejich součástí chromozomy 5, 7, 8, 10, 11, 12, 17 a 21 (Mrózek 2008; Marchesi *et al.* 2011). Různé chromozomové aberace jsou popisovány i u jednotlivých morfologických FAB subtypů. Tyto přestavby mají diagnostický a prognostický význam a lze je také využít k monitorování průběhu onemocnění a k detekci MRN (Haferlach *et al.* 2003, Marcucci *et al.* 2004, Grimwade *et al.* 2010a).

Prognostické skupiny podle nálezu při cytogenetickém vyšetření	
Příznivá prognóza	
t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	
inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	
t(15;17)(q24;q21); <i>PML-RARA</i>	
Středně příznivá prognóza	
Normální karyotyp	
t(9;11)(p22;q23)	
+8, +11, +13, +21	
Ostatní změny (nezařazené do příznivých a nepříznivých)	
Nepříznivá prognóza	
Ztráta chromozomů 5, 7 nebo del(5), del(7)	
Abnormality 11q23	
inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)	
Komplexní změny karyotypu	

Tabulka 1.3: Prognostický význam chromozomových aberací u AML.

t(15;17)(q24;q21)

K nejčastějším translokacím patří t(15;17)(q24;q21), kterou identifikujeme přibližně u 10 % pacientů s AML (Grimwade *et al.* 2010b). U t(15;17) dochází k translokaci genu pro alfa receptor kyseliny retinové (*RARA*) z chromozomu 17 na chromozom 15, do oblasti genu *PML* za vzniku chimérického proteinu PML-RAR α s efektem velmi silného represorového komplexu. Důsledkem pro postiženou buňku je snížená citlivost receptoru na fyziologické koncentrace kyseliny retinové (de Thé *et al.* 1990). Až vysoká hladina kyseliny retinové při podávání ATRA v terapeutických dávkách vede k disociaci tohoto blokujícího komplexu (Mrózek *et al.* 2009; Avvisati *et al.* 2011). AML s touto aberací představují nejlépe charakterizovanou podskupinu - tzv. akutní promyelocytární leukémii (APL). K vyšetření přítomnosti t(15;17) se využívá klasická cytogenetická analýza, příp. FISH s lokus-specifickou sondou. Fúzní transkript PML-RARA prokazujeme pomocí PCR.

Přibližně u 1 % pacientů s APL fúzuje gen *RARA* s jinými geny než *PML*. Mezi tyto variantní translokace patří t(11;17)(q23;q21), t(5;17)(q35;q21), t(11;17)(q13;q21) a der(17), u kterých je gen *RARA* fúzován s genem *ZBTB16*, *NPM1*, *NUMA1*, resp. *STAT5b* (Rohr *et al.* 2012; Grimwade *et al.* 2000). Akutní promyelocytární leukémie s variantními translokacemi mají horší terapeutickou odpověď i prognózu než klasická forma APL s t(15;17).

t(8;21)(q22;q22)

K dalším typickým aberacím patří translokace t(8;21)(q22;q22), která vede ke vzniku fúzního genu *RUNX1-RUNX1T1* (*AML1-ETO*) a vyskytuje se až u 7 % pacientů. Protein RUNX1 je transkripčním aktivátorem kritickým pro diferenciaci hematopoetické kmenové buňky (Speck *et al.* 2002), zatímco gen *RUNX1T1* kóduje transkripční represor. Chimérický protein RUNX1-RUNX1T1 funguje jako transkripční represor a inhibuje expresi RUNX1-dependentních genů (Asou *et al.* 2003; Ben-Ami *et al.* 2013). Translokace t(8;21) je určitelná klasickou cytogenetickou analýzou kostní dřeně, případně molekulárně-cytogeneticky pomocí FISH s použitím celochromozomových sond nebo lokus-specifické sondy. Fúzní transkript RUNX1-RUNX1T1 je možné prokázat metodou PCR.

inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)

Pericentrická inverze chromozomu 16 – inv(16)(p13q22) nebo translokace t(16;16)(p13;q22) vede ke vzniku fúzního transkriptu CBFB-MYH11 a je identifikována přibližně u 5-7 % pacientů s AML (Schwind *et al.* 2013). CBFβ je transkripční faktor, který se přímo neváže na DNA, ale spolupracuje s DNA vazebným (DNA-binding) transkripčním faktorem RUNX1, čímž zvyšuje svou schopnost vázat se na DNA a regulovat transkripci (Lutterbach *et al.* 2000). Identifikace této změny je možná pomocí klasické cytogenetiky, ale v rutinní praxi tuto změnu obvykle potvrzujeme molekulárně-biologicky, příp. molekulárně-cytogeneticky metodou FISH s lokus-specifickou sondou.

Aberace postihující gen *KMT2A* (dříve *MLL*)

Aberace genu *KMT2A* lokalizovaného v oblasti 11q23 jsou popisovány u 10 % všech akutních hematologických malignit zahrnujících myeloidní, lymfoblastické, bifenotypické a sekundární leukémie (Chowdhury a Brady 2008; Qian *et al.* 2010). Dnes je známo více než 100 různých translokací zahrnujících gen *KMT2A*, a to u dětských i dospělých pacientů s AML. Na molekulární úrovni bylo dosud charakterizováno 79 partnerských genů (Meyer *et al.* 2009; Meyer *et al.* 2013). Kromě translokací jsou časté i další aberace genu *KMT2A*, především amplifikace a delece, případně také inverze nebo inzerce. Protein *KMT2A* se nachází v jádře, kde je součástí proteinového komplexu. Jeho role spočívá v remodelaci, acetylaci, deacetylaci a methylaci nukleozomů a histonů, čímž ovlivňuje buněčnou diferenciaci, apoptózu, proliferaci a regulaci buněčného cyklu (Marschalek 2011). Translokace zahrnující gen *KMT2A* jsou obvykle reciproké a balancované. Na nukleotidové úrovni však mohou být přítomny i krátké delece, inverze, inzerce nebo amplifikace (Aplan 2006). U AML se nejčastěji vyskytují tyto translokace: t(6;11)(q27;q23), t(9;11)(p22;q23), t(10;11)(p12;q23) a t(11;19)(q23;p13) (Gué *et al.* 2006). Prognóza pacientů s translokacemi zahrnujícími gen *KMT2A* je velmi nepříznivá (Grimwade *et al.* 2010b; Marchesi *et al.* 2011). Výjimku tvoří pouze t(9;11)(p22;q23), která má intermediární prognózu (Marchesi *et al.* 2011).

AML s normálním karyotypem

Přibližně u 40 % dospělých pacientů s AML nalézáme normální karyotyp – 46,XX, resp. 46,XY (Gregory *et al.* 2009; Bacher *et al.* 2009; Grimwade *et al.* 2010b). U těchto pacientů jsou časté mutace v hematologicky významných genech, které identifikujeme pomocí analýz založených na přímém sekvenování. Jedná se např. o mutace genu *NPM1*, interní tandemovou duplikaci genu *FLT3* (*FLT3-ITD*), mutace postihující gen pro *CEBPA* či parciální tandemovou duplikaci genu *KMT2A* (Baldus *et al.* 2007; Gregory *et al.* 2009).

1.1.2 Genové mutace u AML

Mutace v hematologicky významných genech jsou užitečné zejména pro prognostickou stratifikaci pacientů s AML, u kterých nebyla nalezena žádná chromozomová aberace. Dále mají velký význam jako markery pro sledování minimální reziduální nemoci – kapitola 1.3.

Gen *NPM1* (nukleofosmin 1)

Mutace v genu *NPM1* (5q35) identifikujeme přibližně u 30 % pacientů s AML (Falini *et al.* 2005). Tento gen kóduje fosfoprotein nukleofosmin 1, lokalizovaný převážně v jádře, který usnadňuje transport ribozomálních proteinů přes jadernou membránu. Pokud je gen *NPM1* mutován, dochází k abnormální cytoplazmatické lokalizaci nukleofosminu. Nejčastějším typem mutace je tzv. mutace A, u které je duplikován úsek 4 bází „TCTG“ v pozici 956-959. Tento typ mutace je přítomen u většiny pacientů (Falini *et al.* 2005).

Až u 85 % pacientů je mutace *NPM1* asociována s normálním karyotypem, u zbylých 15 % případů byly popsány sekundární chromozomové abnormality, např. trizomie chromozomu 8, trizomie chromozomu 4 a del(9q) (Schnittger *et al.* 2005; Döhner *et al.* 2008). Mutace v genu *NPM1* může být nalezena také společně s dalšími genovými mutacemi, např. v genu *FLT3* a *IDH1* (Marcucci *et al.* 2010). Prognosticky příznivý význam mutovaného *NPM1* se prosadí jen tehdy, není-li současně přítomen mutovaný *FLT3* (*FLT3-ITD*) (Verhaak *et al.* 2005; Döhner *et al.* 2010).

Gen *FLT3* (fms-related tyrosine kinase 3)

Gen *FLT3* je lokalizován na chromozomu 13 (13q12) a kóduje transmembránový receptor s tyrozin kinázovou doménou. FLT3 aktivace obecně vede k regulaci řady buněčných procesů, které jsou kritické pro řízení normální krvetvorby a buněčného růstu (Meshinchi a Appelbaum 2009). K nejčastějším mutacím genu *FLT3* u AML patří interní tandemové duplikace - *FLT3*-ITD, které postihují juxtamembránovou doménu receptoru a bodové mutace postihující kinázovou doménu - *FLT3*-TKD. Duplikace jsou variabilní, obvykle postihují oblast 14. exonu (Stirewalt *et al.* 2006; Meshinchi a Appelbaum 2009). V případě AML s normálním karyotypem je mutace *FLT3*-ITD prokazována přibližně u 20 % pacientů (Schlenk *et al.* 2008). Průkaz této mutace je nezávislým nepříznivým prognostickým faktorem (Gale *et al.* 2008).

Gen *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha)

CEBPA je gen lokalizovaný na chromozomu 19 (19q13), který kóduje transkripční faktor a uplatňuje se jako klíčový regulátor diferenciací granulocytů (Rosenbauer a Tenen 2007). Mutace v genu *CEBPA* často nalézáme u pacientů s normálním karyotypem a jsou dvou různých typů: nesmyslná („nonsense“) mutace postihující N-konec proteinu, která má za následek vznik zkrácené formy proteinu CEBPA a dále mutace bez posunu čtecího rámce („in-frame“) v C-koncové oblasti, jejíž následkem dochází ke snížení vazebné aktivity proteinu vůči DNA (Koschmieder *et al.* 2009; Marcucci *et al.* 2011). Mutace v genu *CEBPA* pozorujeme přibližně u 5-10 % pacientů s AML a jsou spojeny s intermediární prognózou (Marcucci *et al.* 2011).

Gen *KMT2A* (lysine /K/-specific methyltransferase 2A)

U 6 – 10 % dospělých pacientů s AML identifikujeme parciální tandemovou duplikaci (PTD) genu *KMT2A*. Tato aberace se vyskytuje převážně u nemocných s normálním karyotypem nebo s trizomií chromozomu 11 a je prognosticky nepříznivá, zejména u starších pacientů (Caligiuri *et al.* 1998; Döhner *et al.* 2002; Mrózek *et al.* 2007). Duplikace genu *KMT2A* obvykle zahrnuje exony 2 až 8 (Caligiuri *et al.* 1998).

Mezi další geny, studované u AML na molekulární úrovni, patří: *TP53*, *WT1*, *RAS*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *TET2*, *BCOR* atd. (Ghanem *et al.* 2012; Grossmann *et al.* 2011; Haferlach *et al.* 2012b; Chiaretti *et al.* 2014). V současné době se výzkum zaměřuje na mutační screening vybraného panelu genů pomocí sekvenování nové

generace (next-generation sequencing – NGS). NGS technologie jsou založeny na principu masivního paralelního sekvenování a umožňují sekvenaci až milionů molekul DNA současně. V posledních letech bylo pomocí NGS provedeno velké množství studií, které poskytly komplexnější molekulární charakterizaci AML a vedly k objevu nových genů a k identifikaci velkého počtu rekurentních mutací (Ley *et al.* 2008; Ley *et al.* 2010; Graubert a Mardis 2011; Rao a Smith 2013).

První celogenomový sekvenační projekt byl realizován na nádorovém a normálním vzorku téhož pacienta s cytogeneticky normální AML a vedl k identifikaci osmi nových somatických mutací zúčastněných v patogenezi AML a několika somatických inzercí a delecí (Ley *et al.* 2008). U pacientů s AML s normálním cytogenetickým nálezem byly dále identifikovány rekurentní mutace genů *IDH1/2* a *DNMT3A*, které se vyskytují až u 27 %, resp. u 30 % pacientů (Rakheja *et al.* 2012; Ley *et al.* 2010).

Popsané změny, identifikované pomocí sekvenování nové generace, mohou vést především ke zlepšení stratifikace AML pacientů, ale také k vývoji a optimalizaci nových léčebných protokolů.

1.1.3 Zvýšená genová exprese

Kromě chromozomových aberací a genových mutací bylo prokázáno, že zvýšená exprese některých genů, zahrnutých v regulaci krvetvorby, také patří k důležitým prognostickým faktorům. Mezi tyto geny patří například geny *BAALC*, *ERG*, *MNI*, *EVII* a *WT1*.

Gen *BAALC* (brain and acute leukemia, cytoplasmic)

Zvýšená exprese genu *BAALC* (8q22) byla poprvé popsána u pacientů s AML, u kterých byla nalezena trizomie chromozomu 8. Později byla také identifikována u pacientů s normálním karyotypem, kde je asociována se špatnou prognózou (Baldus *et al.* 2003). Funkce genu *BAALC* a jeho role v leukemogenezi není doposud zcela známa, pravděpodobně hraje roli v blokaci myeloidní diferenciaci (Heuser *et al.* 2012).

Gen *ERG* (ETS-related gene)

Gen *ERG* (21q22) patří do rodiny ETS (erythroblast transformation-specific) transkripčních faktorů. Jeho nadměrná exprese koreluje se zvýšenou regulací mnoha

genů zahrnutých v buněčné proliferaci, diferenciaci a apoptóze. Aberantní exprese genu *ERG* byla poprvé popsána u pacientů s komplexním karyotypem a abnormalitami chromozomu 21 (Gregory *et al.* 2009). Aberantní exprese *ERG* u pacientů s karyotypově normální AML je spojena se špatnou prognózou.

Gen *MNI* (meningioma 1)

Gen *MNI* kóduje transkripční koaktivátor MN1. U pacientů s AML je součástí translokace t(12;22)(p13;q11), která vede ke vzniku fúzního genu *MNI-TEL*. Vysoká exprese *MNI* je také často identifikována u AML pacientů s normálním karyotypem a významně koreluje s výskytem nemutovaného genu *NPM1*, špatnou odpovědí na chemoterapii a s vysokým rizikem relapsu (Gregory *et al.* 2009).

Gen *MECOM* (*MDS1* and *EVII* complex locus)

EVII je protein, který se uplatňuje v řízení proliferace hematopoetické kmenové buňky, a který je kódován genem *MECOM* na chromozomu 3q26. Až u 8 % pacientů *de novo* AML pozorujeme jeho zvýšenou expresi, která vzniká důsledkem chromozomových přestaveb oblasti 3q26 (inverze, translokace), ale byla popsána také u pacientů bez prokázané aberace 3q26, tudíž k aktivaci *EVII* zřejmě dochází i jinými mechanismy (Arai *et al.* 2011; Haferlach *et al.* 2012a). Navíc bylo prokázáno, že u některých pacientů s přítomnou aberací oblasti 3q26 ke zvýšené expresi *EVII* nedochází (Langabeer *et al.* 2001). U přibližně 2 % pacientů s AML v karyotypu nalézáme inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26). U této aberace dochází k aktivaci *EVII* pomocí promotoru genu *RPNI* (ribophorin 1) lokalizovaného v oblasti 3q21 (Suzukawa *et al.* 1994). Tato aberace se v současné době řadí do klasifikace WHO jako samostatná klinicko-patologická entita (Tabulka 1.2).

Gen *WT1* (Wilms tumor 1)

Gen *WT1* je lokalizován na chromozomu 11 (11p13). Jeho produktem je transkripční faktor, který reguluje expresi mnoha genů spojených s proliferací, diferenciací a apoptózou. *WT1* byl poprvé popsán jako gen zodpovědný za dětskou nefrologickou malignitu - Wilmsův tumor (Haber *et al.* 1990). V tomto případě dochází k inaktivaci genu *WT1* mutací a předpokládala se tak funkce tumor supresoru. Ukázalo se však, že u řady malignit se *WT1* chová naopak jako onkogen. *WT1* je nadměrně exprimován u většiny pacientů s AML a celková exprese na úrovni mRNA se používá

jako marker pro sledování MRN (Candoni *et al.* 2011; Gray *et al.* 2012). Existuje však i několik prací, které takový význam pro *WT1* nepotvrzují (Yanada *et al.* 2004; Miglino *et al.* 2011).

1.2 Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

Podobně jako AML, je i ALL značně heterogenní onemocnění, které vzniká maligní transformací kmenové hematopoietické buňky. Jsou-li postiženy progenitory B-lymfocytární řady, jedná se o tzv. B-ALL (B-buněčná ALL). ALL vycházející z progenitorů T-lymfocytární řady se nazývá T-ALL (T-buněčná ALL) a představuje přibližně 25 % dospělých ALL (Wang *et al.* 2013).

ALL je nejčastějším nádorovým onemocněním v dětském věku, incidence v dospělé populaci je relativně nízká a činí 1,2 případu na 100 000 obyvatel. V dospělosti představuje ALL jen 1 % nádorových onemocnění a tvoří asi 20 % všech akutních leukémií (Bassan *et al.* 2011). Klinické příznaky pacientů bývají většinou značně nespecifické. Nejčastějšími potížemi jsou slabost, únava a dušnost, kožní a slizniční krvácení, recidivující akutní infekty obtížně reagující na léčbu, bolesti břicha, zvětšené lymfatické uzliny či bolesti svalů a kloubů. Může se objevit i postižení jiných orgánů než krve a kostní dřeně – hepatomegalie a splenomegalie, mediastinální tumor (častěji u T-ALL), infiltrace jiných orgánů (častěji u B-ALL) nebo postižení centrálního nervového systému (Adam *et al.* 2008).

Francouzsko-americko-britská klasifikace (FAB) rozlišuje tři podtypy blastů ALL - L1, L2 a L3 (Tabulka 1.4). Klinický význam tohoto dělení nemá u dospělých velký význam, protože neobsahuje prognostické informace. Nejnovější WHO klasifikace rozdělila ALL na skupinu prekurzorových B- a T- lymfoblastických leukémií a skupinu odpovídající L3 ve FAB klasifikaci – Burkittovu leukémii/lymfom – zařadila mezi malignity ze zralých B-buněk (Abdul-Hamid 2011) – Tabulka 1.5.

V periferní krvi nemocných nacházíme anémii, trombocytopenii a leukocytózu. Vyšetření kostní dřeně prokáže infiltraci lymfoblasty. Zásadní význam v diagnostice ALL má vyšetření průtokovou cytometrií, které na základě exprese povrchových a cytoplazmatických antigenů umožňuje stanovit diagnózu a typ ALL. Významné je také cytogenetické vyšetření, příp. molekulárně-cytogenetické vyšetření a metody molekulární biologie, které umožňují sledovat MRN – kapitola 1.3.

„French-American-British“ (FAB) klasifikace	
L1	Malé uniformní blasty s bazofilní cytoplazmou
L2	Heterogenní, různě velké blasty s nepravidelným tvarem jádra
L3	Velké uniformní blasty

Tabulka 1.4: Klasifikace ALL dle FAB.

„World Health Organization“ (WHO) klasifikace ALL	
I. Akutní lymfoblastická leukémie	
• Prekurzorová B-ALL	
t(9;22)(q34;q11); <i>BCR-ABL1</i>	
t(v;11)(v;q23); přestavby genu <i>KMT2A</i>	
t(1;19)(q23;p13); <i>TCF3-PBX1</i>	
t(12;21)(p13;q22); <i>TEL-AML1</i>	
Hypodiploidní karyotyp (<42 chromozomů)	
Hyperdiploidní karyotyp (>50 chromozomů)	
• Prekurzorová T-ALL	
II. Burkittův lymfom	
III. Bifenotypická akutní leukémie	

Tabulka 1.5: Klasifikace ALL dle WHO.
Abdul-Hamid 2011

1.2.1 Cytogenetické aberace u ALL

Konvenční cytogenetické vyšetření a molekulárně-cytogenetické vyšetření pomocí FISH odhalí až u 70 % pacientů patologickou chromozomovou aberaci (Mrózek *et al.* 2004). Nejčastějším a prognosticky nejvýznamnějším nálezem je tzv. filadelfský (Ph) chromozom – resp. derivovaný chromozom 22, který vzniká reciprokou translokací chromozomů 9 a 22 - t(9;22)(q34;q11). Při této translokaci je protoonkogen *ABL1* z koncové části dlouhého ramene chromozomu 9 fúzován s genem *BCR* na chromozomu 22. Výsledkem translokace je fúzní transkript *BCR-ABL1*, který dává vznik trvale aktivované kináze (Faderl *et al.* 2003). Tato aberace je pozorována přibližně u 25 % dospělých pacientů s B-ALL a je spojena se špatnou prognózou (Gleissner *et al.* 2001; Moorman *et al.* 2007). Dalším nálezem jsou změny týkající se genu *KMT2A*, nejčastěji translokace t(4;11)(q21;q23)/*KMT2A-AFF1*, která je pozorována u 8-10 % pacientů s B-ALL a je spojena se špatnou prognózou (Moorman 2012; Marks *et al.* 2013). Dále je u dospělých pacientů s ALL často identifikována hyperdiploidie (u 2-15 % pacientů) a hypodiploidie (až u 10 % pacientů) (Faderl *et al.* 2010).

1.2.2 Přestavby genů pro IgH a TCR

Klíčovou charakteristikou pacientů s ALL je přítomnost specifické klonální přestavby genů pro těžký imunoglobulinový řetězec nebo T-buněčný receptor (IgH/TCR). Tato unikátní sekvence vzniká v průběhu vývoje lymfocytu přeskupováním genových segmentů (tzv. V, D, J segmenty) a je pro každého pacienta specifická (van Dongen a Wolvers-Tettero 1991). Této charakteristiky se úspěšně využívá k detekci zbytkové populace leukemických buněk a následné kvantifikaci v rámci sledování minimální reziduální nemoci (Brüggemann *et al.* 2012; Schrappe 2012).

1.3 Minimální reziduální nemoc (MRN)

Minimální reziduální nemoc byla u pacientů s AL studována již v 70. letech minulého století (Gutterman *et al.* 1974). MRN je definována jako subklinická úroveň nemoci, kdy v průběhu terapie již nejsou běžnými cytologickými metodami detekovány maligní buňky. Pacient je v kompletní hematologické remisi, ale v jeho organismu může být přítomno až 10^{10} maligních buněk. Toto množství je nadále vysoké, a právě tyto přežívající nádorové buňky mohou způsobit relaps onemocnění. Od počátku 90. let jsou ve větší míře vyvíjeny techniky, které umožňují detekovat tuto submikroskopickou hladinu nádorových buněk. Jejich principem je nalezení vhodného znaku maligní buňky, který ponese celý klon a bude se jím lišit od zdravých buněk. V současné době jsou preferovány zejména techniky s vysokou senzitivitou, která by měla dosahovat alespoň 10^{-4} , a s možností kvantifikace zbytkové nádorové populace buněk. K těmto technikám patří především techniky založené na PCR a průtokové cytometrii (Tabulka 1.6). Uvedené metody umožňují velmi citlivě a specificky monitorovat reziduální leukemickou populaci buněk a patří ke „zlatému standardu“ v rutinní diagnostice AL (Schnittger *et al.*, 2003; Kern *et al.*, 2005; Weissner *et al.* 2005; Kern *et al.* 2008; Jorgensen a Chen 2011; Abdelhamid *et al.* 2012; Buccisano *et al.*, 2012; Miyazaki *et al.* 2012; Hourigan a Karp 2013; Garand *et al.* 2013).

Detekce a kvantifikace MRN je v současné době klíčovým nástrojem ke zhodnocení kvality odpovědi pacienta na léčbu, jelikož umožňuje predikovat její selhání, případně u pacientů po transplantaci kostní dřeně dovoluje včas předpovědět blížící se relaps onemocnění. V případě selhání odpovědi na léčbu se klinik rozhoduje o vhodné úpravě léčebného protokolu. V případě molekulárního relapsu, který předchází plnému klinickému relapsu, klinik dokáže včas terapeuticky intervenovat a zabránit tak plnému rozvinutí relapsu onemocnění. Prognostický význam detekce MRN byl potvrzen mnoha pracemi (Schnittger *et al.*, 2003; Campana 2004; Weissner *et al.* 2005; Kern *et al.*, 2005; Brüggemann *et al.* 2006; Szczepański 2007; Kern *et al.* 2008; Campana 2010; Candoni *et al.* 2011; Abdelhamid *et al.* 2012; Buccisano *et al.* 2012; Miyazaki *et al.* 2012; Brüggemann *et al.* 2012; Hourigan a Karp 2013; Garand *et al.* 2013).

	Průtoková cytometrie	PCR detekce fúzních transkriptů	PCR detekce přestavěb IgH/TCR
Senzitivita	10^{-3} - 10^{-4}	10^{-4} - 10^{-6}	10^{-4} - 10^{-5}
AML	~ 94 % pacientů	~ 50 % pacientů	~ 10 % pacientů
ALL	> 95% pacientů	~ 25 % pacientů	90 – 95 % pacientů
Výhody	použitelná u většiny pacientů; relativně levná a rychlá	relativně levná a rychlá; velmi senzitivní; specifická; cíle stabilní v průběhu nemoci; vhodná pro uniformní skupiny pacientů - např. BCR-ABL1+	použitelná u většiny pacientů s ALL; senzitivní; pacient- specifická
Nevýhody	limitovaná senzitivita; imunofenotypový „shift“	jen pro některé pacienty; rozdíly v expresi fúzního transkriptu	časově náročná v době diagnózy

Tabulka 1.6: Metody vyšetřování MRN.
Upraveno podle Szczepański 2007.

1.3.1 Detekce MRN pomocí PCR

Techniky založené na PCR jsou specifické a dosahují citlivosti 10^{-5} - 10^{-6} (tzn. je možná detekce jedné leukemické buňky v 10^5 - 10^6 buňkách kostní dřeně/periferní krve) (Hokland *et al.* 2011; Jorgensen a Chen 2011). K přesné kvantifikaci leukemických buněk se nejčastěji využívá metoda real-time PCR (v případě detekce na úrovni RNA navíc spojená s reverzní transkripcí), která umožňuje přímou kvantifikaci PCR produktu v průběhu reakce. K detekci vznikajícího produktu mohou být použity různé systémy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Dnes se uplatňuje především real-time PCR využívající oligonukleotidové sondy, které zajišťují vysokou specifitu reakce (van Dongen *et al.* 2003; van der Velden a van Dongen 2009; Grimwade *et al.* 2009; Schnittger *et al.* 2009; Campana 2010; Yin *et al.* 2012; Jourdan *et al.* 2013).

Limitací k použití technik PCR je zejména nedostupnost vhodných specifických markerů maligních buněk, a to především u pacientů s AML. Dle několika prací není možné identifikovat vhodný marker pro sledování MRN téměř u poloviny dospělých pacientů s AML (Kern *et al.* 2010; Candoni *et al.* 2011; Paietta 2012; Buccisano *et al.* 2012).

1.3.1.1 Markery pro sledování MRN pomocí PCR

U dospělých pacientů s AML slouží jako cíl ke sledování MRN chromozomové abnormality (resp. fúzní transkripty, které z nich vznikají) a genové mutace. Jako alternativní cíl pro sledování MRN lze případně využít i změny exprese některých genů - např. *WT1*, *EVII*, *BAALC*... (Cilloni *et al.* 2009; Weissner *et al.* 2007; Weber *et al.* 2014).

K detekci MRN u dospělých pacientů s ALL se nejčastěji využívají genové přestavby, příp. fúzní transkripty.

Zatímco u naprosté většiny dospělých pacientů s ALL molekulární marker pro sledování MRN identifikujeme (Bacher *et al.* 2009), u dospělých pacientů s AML je vhodný marker nalezen pouze u poloviny případů (Kern *et al.* 2010; Paietta 2012; Buccisano *et al.*, 2012).

Fúzní transkripty

Výsledkem některých chromozomových aberací (Kapitola 1.1.1) identifikovaných při standardním cytogenetickém vyšetření kostní dřeně (příp. periferní krve) je vznik fúzních transkriptů, které je možné detekovat na molekulární úrovni pomocí PCR. Tyto transkripty tedy mohou sloužit jako specifické cíle k detekci MRN. U pacientů s AML jde nejčastěji o fúzní transkript PML-RARA, dále RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) a CBFβ-MYH11 (Mrózek *et al.* 2001; Jorgensen a Chen 2011). U pacientů s ALL slouží jako cíl zejména fúzní transkripty BCR-ABL1, KMT2A-AFF1 (MLL-AF4) a TCF3-PBX1 (Szczepański *et al.* 2001; Bacher *et al.* 2009).

K identifikaci fúzních transkriptů u pacientů s AL v naší laboratoři využíváme unikátní diagnostickou soupravu AcutePlexX CE (Plachý *et al.* 2011). Tento systém je založen na principu multiplexní real-time PCR a umožňuje detekci více než 100 známých fúzních transkriptů a jejich sestřihových variant v 10 paralelních PCR reakcích – Tabulka 1.7.

Genové mutace

Pomocí PCR můžeme jako cíl k detekci MRN využít také rekurentní genové mutace. U pacientů s AML jde nejčastěji o mutaci v genu *NPM1*, která je identifikována až u třetiny z nich. Dále se jako cíl využívají i výše popsané mutace v genech *FLT3*, *KMT2A* a *CEBPA*.

Mix	Chromozomová aberace	Fúzní partneři	Mix	Chromozomová aberace	Fúzní partneři
A	t(15;17)	PML/RARA (bcr 1,2,3)	F	t(4;11)	KMT2A/AFF1
A	t(8;21)	RUNX1/RUNX1T1	F	t(9;11)	KMT2A/MLLT3
B	t(9;22)	BCR/ABL1	F	t(11;19)	KMT2A/MLLT1
B	t(3;21)	RUNX1/EVI1/MDS1/EAP	F	t(6;11)	KMT2A/MLLT4
B	t(16;21)	RUNX1/CBFA2T3	F	t(1;11)	KMT2A/EP515
B	t(3;5)	MLF1/NPM1	F	t(11;19)	KMT2A/ELL
C	t(10;11)	NUP98/HHEX	F	t(10;11)	KMT2A/MLLT10
C	t(7;11)	NUP98/HOXA9	G	t(X;11)	KMT2A/SEPT6
C	inv(11)	NUP98/DDX10	G	t(11;17)	KMT2A/MLLT6
C	t(11;20)	NUP98/TP1	G	t(1;11)	KMT2A/MLLT11
C	t(5;11)	NUP98/NSD1	G	t(11;17)	KMT2A/SEPT9
C	t(1;11)	NUP98/PRRX1	G	t(X;11)	KMT2A/FOXO4
C	t(2;11)	NUP98/HOXD13	G	t(11;19)	KMT2A/SH3GL1
C	t(3;11)	NUP98/TP2B	G	t(11;19)	KMT2A/MYO1F
C	t(11;18)	NUP98/SETBP1	G	t(10;11)	KMT2A/TET1
C	t(11;12)	NUP98/HOXC11	G	t(11;22)	KMT2A/EP300
C	t(8;11)	NUP98/WHSC1L1	G	t(11;16)	KMT2A/CREBBP
C	t(2;11)	NUP98/HOXD11	H	dup(11)	KMT2A-PTD
C	t(11;12)	NUP98/RARG	H	t(8;22)	KAT6A/EP300
C	t(X;11)	NUP98/HMGB3	H	inv(8)	KAT6A/NCOA2
C	t(11;17)	NUP98/PHF23	H	t(8;16)	KAT6A/CREBBP
C	inv(11)	NUP98/KMT2A	H	t(16;21)	FUS/ERG
C	t(3;11)	NUP98/LNP1	I	t(1;22)	RBM15/MKL1
C	t(9;11)	NUP98/PRRX2	I	t(3;3), inv(3)	RPN1/MECOM
D	inv(16)	CBFB/MYH11	I	t(5;12)	ETV6/PDGFBR
E	t(6;9)	DEK/NUP214	I	t(12;22)	ETV6/MN1
E	t(11;17)	NUMA1/RARA	I	t(3;12)	ETV6/MECOM
E	der(17)	PRKAR1A/RARA	I	t(12;13)	ETV6/CDX2
E	t(X;17)	BCOR/RARA	I	t(12;21)	ETV6/RUNX1
E	t(4;17)	FIP1L1/RARA	I	t(12;15)	ETV6/NTRK3
E	t(5;17)	NPM1/RARA	I	t(1;12)	ETV6/ABL2
E	der(17)	STAT5B/RARA	ALL	t(1;19)	TCF3/PBX1
E	t(11;17)	ZBTB16/RARA	ALL	del(1)	STIL/TAL1

Tabulka 1.7: AcutePlexX CE.

Seznam rekurentních chromozomových abnormalit detekovaných u pacientů s AL.

Exprese genů

Někteří autoři využívají ke sledování MRN u pacientů s AL aberantní expresi genů. Mezi nejznámější patří geny *WT1*, *BAALC* a *EVII*. Nicméně, molekulární analýzy založené na kvantifikaci genové exprese nedosahují vždy výše zmíněné citlivosti (alespoň 10^{-4}), která závisí na expresi pozorované v záchytu onemocnění (Cilloni *et al.* 2009; Barjesteh *et al.* 2003; Weber *et al.* 2014; Weissner *et al.* 2007).

Genové přestavby IgH/TCR

U většiny dospělých pacientů s ALL (> 85%) identifikujeme cíl pro sledování MRN v podobě pacient-specifické klonální přestavby genů pro těžké řetězce imunoglobulinů, příp. pro T-buněčné receptory (Brüggemann *et al.* 2006; Garand *et al.* 2013). Metodika screeningu přestaveb imunoreceptorových genů je od roku 1999 standardizovaná (BIOMED-1, BIOMED-2) (Langerak *et al.* 2012). Jedná se o detekci kompletních V-(D)-J a nekompletních D-J přestaveb IgH a TCR (TCR β , TCR γ a TCR δ), která se provádí pomocí klasické PCR. V případě nálezu klonálního produktu se daná přestavba sekvenuje pro určení přesné sekvence přechodových úseků V-(D)-J oblastí. Na výslednou sekvenci DNA je navržen test pro real-time PCR, čímž je umožněno sledování MRN (van Dongen *et al.* 2003). Obrovskou výhodou, oproti průtokové cytometrii, je stabilita přestaveb na DNA úrovni i v případě měněního se fenotypu v průběhu terapie a vyšší senzitivita. Určitou limitací popsané metodiky může být detekce oligoklonality v době diagnózy. Sledování MRN je pak problematické, protože klony mohou být zastoupeny v různém poměru a relaps onemocnění může nastat z kteréhokoli klonu. Proto se při zjištění oligoklonality doporučuje sledovat maximální možné množství klonů.

1.3.2 Detekce MRN pomocí průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je postavena na detekci specifických povrchových i cytoplazmatických markerů leukemických buněk (tzv. LAIP = leukemia associated immunophenotype) a umožňuje detekovat jednu leukemickou buňku v 10^3 - 10^4 zdravých buněk (citlivost 10^{-3} – 10^{-4}). Hlavní výhodou průtokové cytometrie je možnost jejího využití téměř pro všechny pacienty s AL, leukemický imunofenotyp se daří popsat ve více než 95 % případů s ALL a přibližně u 94 % pacientů s AML (Szczepeński 2007; Al-Mawali *et al.* 2008). Nevýhodou je riziko falešné positivity

z důvodu možné podoby leukemického fenotypu s fenotypem regenerujících nemaligních buněk krvetvorby, stejně jako riziko falešné negativity z důvodu nestability imunofenotypu v průběhu léčby pacienta – tzv. imunofenotypový „shift“ (Macedo *et al.* 1996; Oelschlagel *et al.* 2000; Baer *et al.* 2001). Určitou limitaci také představuje nižší citlivost ve srovnání s technikami založenými na PCR a vysoké nároky na odbornou erudici obsluhy a zkušenost při interpretaci získaných dat (Szczepański 2007; Jorgensen a Chen 2011; Miyazaki *et al.* 2012; Brüggemann *et al.* 2012).

2 Cíle práce

Moderními molekulárně-biologickými technikami založenými na PCR identifikujeme vhodný molekulární marker pro sledování MRN pouze u poloviny dospělých pacientů s AML. Z tohoto důvodu je žádoucí navrhnout unikátní přístup, který by umožnil identifikovat markery i u pacientů, u kterých rutinním screeningem (detekce fúzních transkriptů a genových mutací) žádný cíl pro sledování MRN nenalezneme. Cílem této práce bylo:

- Charakterizovat abnormality karyotypu u dospělých pacientů s nově diagnostikovanou akutní leukémií pomocí cytogenetických a molekulárně-cytogenetických technik
- Pomocí konvenční mikrodisekce izolovat zlomová místa derivovaných chromozomů
- Mapovat zlomová místa až na úroveň jednotlivých nukleotidů pomocí sekvenování nové generace a long-range PCR
- Navrhnout a optimalizovat unikátní pacient-specifické testy založené na real-time PCR pro sledování MRN
- Zhodnotit význam screeningového vyšetření zaměřeného na identifikaci markerů pro senzitivní sledování minimální reziduální nemoci

3 Materiál a metodika

3.1 Analyzované vzorky

K návrhu a optimalizaci přístupu k identifikaci nových molekulárních markerů byla použita buněčná linie K562 (American Type Culture Collection, USA).

Po otestování na buněčné linii byl dále analyzován vzorek kostní dřeně pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií, u kterého byl pomocí screeningu fúzních transkriptů (AcutePlexX CE) nalezen cíl pro sledování MRN. Kvantifikace tohoto cíle sloužila jako srovnání s kvantifikacemi nově identifikovaných cílů pomocí optimalizovaného přístupu.

Dále byly analyzovány vzorky kostní dřeně šesti pacientů se stanovenou diagnózou akutní myeloidní leukémie, u kterých nebyl identifikován vhodný cíl pro sledování MRN. Kostní dřeň byla odebírána v záchyту onemocnění a dále v průběhu léčby pacienta. Vzorky byly odebírány na základě informovaného souhlasu pacienta a analyzovány v laboratoři synlab genetics s.r.o., Praha.

Průměrný věk pacientů při stanovení diagnózy AL byl 57 let.

3.2 Zpracování vzorků

Vzorky kostní dřeně byly odebírány do sterilních zkumavek s antikoagulancií, transportovány do laboratoře, a poté ihned zpracovány pro účely izolace nukleových kyselin (vzorek nabírán do zkumavek s EDTA) a pro cytogenetické a molekulárně-cytogenetické analýzy (vzorek nabírán do zkumavek s heparinem).

Výjimkou byl vzorek pacienta 2, u kterého jsme z Cytogenetické laboratoře FN Hradec Králové obdrželi již zpracované buňky ve fixačním roztoku (methanol : kyselina octová), nikoli vzorek kostní dřeně ve zkumavce s heparinem.

3.2.1 Izolace nukleových kyselin a reverzní transkripce

DNA i RNA byly izolovány z mononukleární frakce kostní dřeně pacientů s AL v záchyту onemocnění a v jednotlivých bodech sledování MRN. DNA byla izolována pomocí automatického izolátoru MagNA Pure (Roche, Německo). RNA byla izolována pomocí TRI Reagent (Sigma-Aldrich, USA), podle návodu uvedeného výrobcem.

Kvalita a koncentrace byla kontrolována pomocí spektrofotometru NanoDrop (ThermoScientific, USA).

RNA ve výsledném množství 1 µg byla přepsána do cDNA systémem Verso cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, USA) podle návodu doporučeného výrobcem.

3.2.2 Detekce fúzních transkriptů a genových mutací

Pro screening fúzních transkriptů u pacientů s nově diagnostikovanou AL byl využit multiplexní reverzně transkripční real-time PCR systém AcutePlexX CE. Jako interní kontrola byl použit gen *ABL1*. Sekvence primerů a sondy pro amplifikaci genu *ABL1* byly následující:

přímý (forward) primer: 5' TCCTCCAGCTGTTATCTGGAAGA 3'

zpětný (reverse) primer: 5' TGGGTCCAGCGAGAAGGTT 3'

sonda: FAM - 5' CCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAGGG 3'-BHQ1

Vyšetřovaný vzorek byl analyzován v duplikátu zároveň s pozitivní a negativní kontrolou. PCR reakce probíhala na platformě Rotor-Gene Q (Qiagen, Německo) s následujícími reakčními podmínkami: počáteční denaturace 8 minut při teplotě 95°C následovaná 45 cykly, které se skládaly z denaturace při 95°C/20 s, nasednutí primerů („annealing“) při 60°C/20 s a elongace při 72°C/20 s.

K detekci genových mutací byla použita klasická PCR následovaná sekvenací produktů na kapilárním sekvenátoru ABI 3130 (kapitola 3.2.10). Takto byly analyzovány geny *NPM1* (exon 12), *CEBPA*, *WT1* (exony 7 a 9), *c-KIT* (exony 8, 9 a 17), *FLT3-ITD* a *KMT2A-PTD*.

3.2.3 Kultivace buněk

Vzorky kostní dřeně byly separovány na hustotním gradientu Histopaque (Sigma-Aldrich, USA). Buňky odebrané z mononukleární frakce kostní dřeně byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI 1640 (PAA Laboratories, Rakousko) za přítomnosti 10% fetálního séra (PAA Laboratories, Rakousko), antibiotik (Penicilin/Streptomycin) a L-glutaminu (PAA Laboratories, Rakousko) při 37°C/5% CO₂ po dobu 24 hodin. Vzorek byl dále zpracován dle standardních cytogenetických postupů – přidání kolcemidu (0,1

μg/ml) (Gibco, UK), hypotonie (0,075M KCl) a fixace směsí methanol/kyselina octová v poměru 3:1.

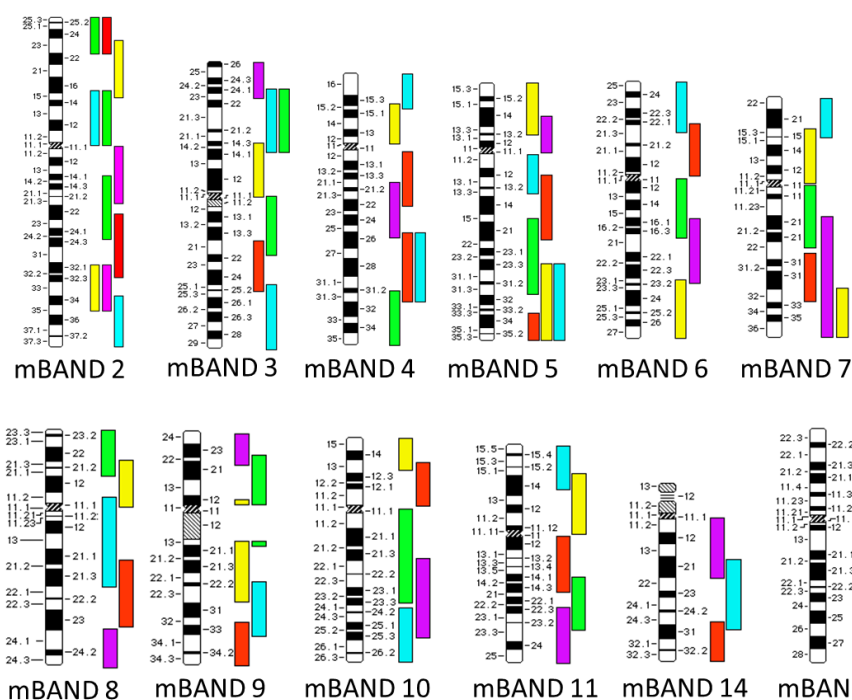
3.2.4 Klasická cytogenetická analýza

Vzorky kostní dřeně pacientů byly analyzovány klasickou cytogenetickou analýzou založenou na G-pruhování, při níž byl sestaven karyotyp. Preparáty byly ošetřeny trypsinem (Sigma-Aldrich, USA), barveny roztokem Giemsa (Gibco, UK) a analyzovány s použitím mikroskopu Olympus BX51 a počítačového programu Ikaros (verze 5.5, MetaSystems, Německo). Výsledek cytogenetického vyšetření byl zapsán v souladu s mezinárodní nomenklaturou ISCN (Schaffer *et al.* 2013). U každého pacienta bylo analyzováno 20 metafází.

Karyotyp pacienta 2 byl analyzován v Cytogenetické laboratoři FN Hradec Králové pomocí R-pruhování. Obrázek karyotypu dodala Mgr. Pavlína Havlíková.

3.2.5 Molekulárně-cytogenetické analýzy

Karyotyp všech pacientů s AL (a buněčné linie K562) byl dále vyšetřen pomocí technik mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace – mFISH a upřesnění zlomů na derivovaných chromozomech bylo provedeno pomocí mnohobarevného pruhování chromozomů s vysokou rozlišovací schopností – mBAND (MetaSystems, Německo) – Obrázek 3.1. Veškeré hybridizační a post-hybridizační kroky se řídily dle doporučeného manuálu výrobce.

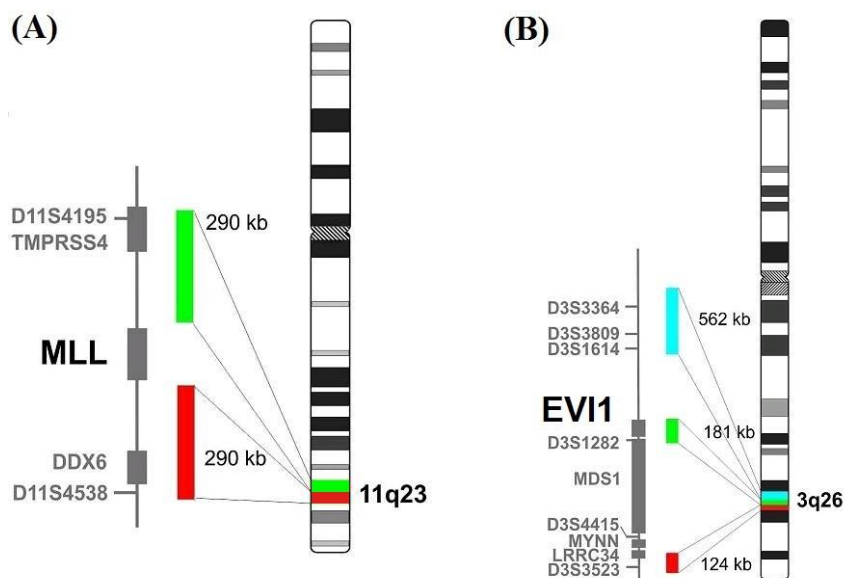


Obrázek 3.1: Schémata použitých kitů pro mBAND analýzu.

Zobrazeny mBAND kity pro chromozomy 2 - 11, 14 a X; převzato z <http://www.metasystems.org/index.php/dna-probe-kits/catalog>; stav k prosinci 2014

Ověření přítomnosti aberací zahrnujících geny *KMT2A* (*MLL*) a *MECOM* (*EVI1*) bylo provedeno lokus-specifickými sondami „XL MLL break-apart probe“, resp. „XL EVI1 break-apart probe“ (MetaSystems, Německo) (Obrázek 3.2). Na preparátu byly spočítány fluorescenční signály alespoň na 20 metafázích a minimálně na 200 interfázních jádrech. Byl vyhodnocen nejen počet, ale také charakter fluorescenčních signálů. Cut-off level byl stanoven na 5 %.

Veškeré analýzy probíhaly s použitím fluorescenčního mikroskopu Axio Imager.Z2 (Zeiss, Německo) a počítačového softwaru Isis (verze 5.4, MetaSystems, Německo).



Obrázek 3.2: Schéma lokus-specifických sond.

Převzato z <http://www.metasystems.org/index.php/dna-probe-kits/catalog> a upraveno; stav k prosinci 2014

(A) Dvoubarevná lokus-specifická sonda pro gen *KMT2A* (*MLL*): zelená část sondy hybridizuje proximálně ke genu *KMT2A* na 11q23; červená složka, ležící distálně, zahrnuje oblast pro lokus D11S4538.

(B) Tříbarevná lokus-specifická sonda pro gen *MECOM* (*EVI1*): modře značená část sondy hybridizuje proximálně ke genu *EVI1* (3q26), zelená část pokrývá celý gen *EVI1* včetně jeho sousedících sekvencí a červená část je specifická pro oblast distální ke genům *MDS1* a *MYNN*.

3.2.6 Chromozomová mikrodisekce

Mikrodisekce derivovaných chromozomů probíhala ve spolupráci s Institut für Human Genetik, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Německo. Buněčné suspenze byly kapány na krycí skla (24 x 60 mm) ošetřená 10% roztokem SDS. Derivované chromozomy byly rozlišovány pomocí fluorescenčně značených region-specifických sond z knihovny „MCB“ (Jena, Německo) a komerčně dostupných centromerických sond (MetaSystems, Německo). Denaturace preparátu a sondy probíhala současně při 73°C/2 min. Hybridizace sond probíhala při 37°C přes noc. Nespecificky navázaná sonda byla odstraněna promytím v 0,4 x SSC pufru při 68 °C po dobu 3 minut.

Vlastní mikrodisekce byla provedena pomocí skleněné jehly (průměr ~ 500 nm) pod invertovaným mikroskopem (Axiovert-135, Axiovert-10, Zeiss, Německo), který byl vybaven elektronickým mikromanipulátorem. Po mikrodisekci byly fragmenty chromozomů (vždy minimálně 6 fragmentů) ošetřeny roztokem proteinázy K a amplifikovány pomocí PCR s degenerovanými primery (DOP-PCR).

3.2.7 DOP-PCR

K amplifikaci disekovaných chromozomových fragmentů pomocí DOP-PCR byl použit primer 5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG 3' ve finální koncentraci 5 μ M a Platinum *Tfi* Exo(-) polymeráza (ThermoScientific, USA). Amplifikace produktů se skládala ze dvou fází: preamplifikační fáze a samotná amplifikace (Telenius *et al.* 1992).

Část amplifikátu byla fluorescenčně značena a použita k ověření specifity disekovaných chromozomových fragmentů (reverzní fluorescenční *in situ* hybridizace).

3.2.8 Sekvenování nové generace (NGS, Next-Generation Sequencing)

K sekvenaci byl využit pyrosekvenační systém GS Junior (Roche, Německo). V průběhu celého procesu přípravy DNA knihovny, klonální amplifikace i vlastního sekvenování bylo postupováno dle návodu výrobce, pouze s drobnou změnou - před úpravou konců fragmentů bylo 500 ng produktů DOP-PCR nejprve přečištěno pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (Qiagen, Německo) a následně pomocí MinElute PCR Purification Kitu (Qiagen, Německo). Pro klonální amplifikaci fragmentů sloužil GS Junior Titanium emPCR Lib-L Kit (Roche, Německo).

3.2.9 Long-range PCR

Primery pro long-range PCR reakci byly navrženy pomocí počítačového programu Vector NTI Advance (Invitrogen, USA, verze 11.5). K amplifikaci long-range PCR produktů byl použit kit Expand Long Range, dNTPack (Roche, Německo). Postup při PCR reakci se řídil doporučeními výrobce. Reakční směs (celkový objem 50 μ l) obsahovala přibližně 200 ng DNA, 5 U Expand Long Range Enzyme Mix, DMSO ve finální koncentraci 5 %, 1x Expand Long Range Buffer s $MgCl_2$, směs nukleotidů ve finální koncentraci 500 μ M a 0,4 μ M každého z navržených primerů. Po úvodní inkubaci (92°C, 8 min) následovalo 35 cyklů amplifikace - denaturace 92°C/30 s, nasednutí primerů („annealing“) 58°C/30 s a elongace 68°C/6 min. Vzniklý PCR produkt byl separován na 0,7% agarozovém gelu.

3.2.10 Sekvenování DNA - Sangerova metoda

Long-range PCR produkty byly vyříznuty z gelu, přečištěny pomocí QIAquick Gel Extraction kitu (Qiagen, Německo) a osekvenovány v obou směrech (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, USA) na analyzátoru ABI 3130 (Applied Biosystems, USA). Obdržené sekvence byly vyhodnoceny v databázi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.2.11 Test pro real-time PCR

Na identifikované sekvence chromozomových zlomů byly navrženy primery a sondy pro real-time PCR. Pro vlastní amplifikaci a kvantifikaci DNA byla připravena reakční směs o celkovém objemu 20 μ l s následujícím složením: Thermo-Start Taq DNA polymeráza (1 U) včetně odpovídajícího pufru (ThermoScientific, USA), dNTPs (deoxyribonukleotidy) (10 μ M) (ThermoScientific, USA), $MgCl_2$ (4 mM) (ThermoScientific, USA), primery a sonda pro konkrétní oblast zlomu, DNA o vstupní koncentraci 200 ng/ μ l a sterilní voda. Jako interní kontrola byl použit gen pro albumin (*ALB*). Sekvence primerů a sondy pro kvantifikaci *ALB* byly následující:

přímý (forward) primer: 5' TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT 3'

zpětný (reverse) primer: 5' CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT 3'

sonda: FAM - 5' TGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGA 3' - BHQ1

Po úvodní inkubaci (95°C, 8 min) následovalo 45 cyklů amplifikace, které se skládaly z denaturace při 95°C/20 s, nasednutí primerů při 61°C/20 s a elongaci při 72°C/20 s.

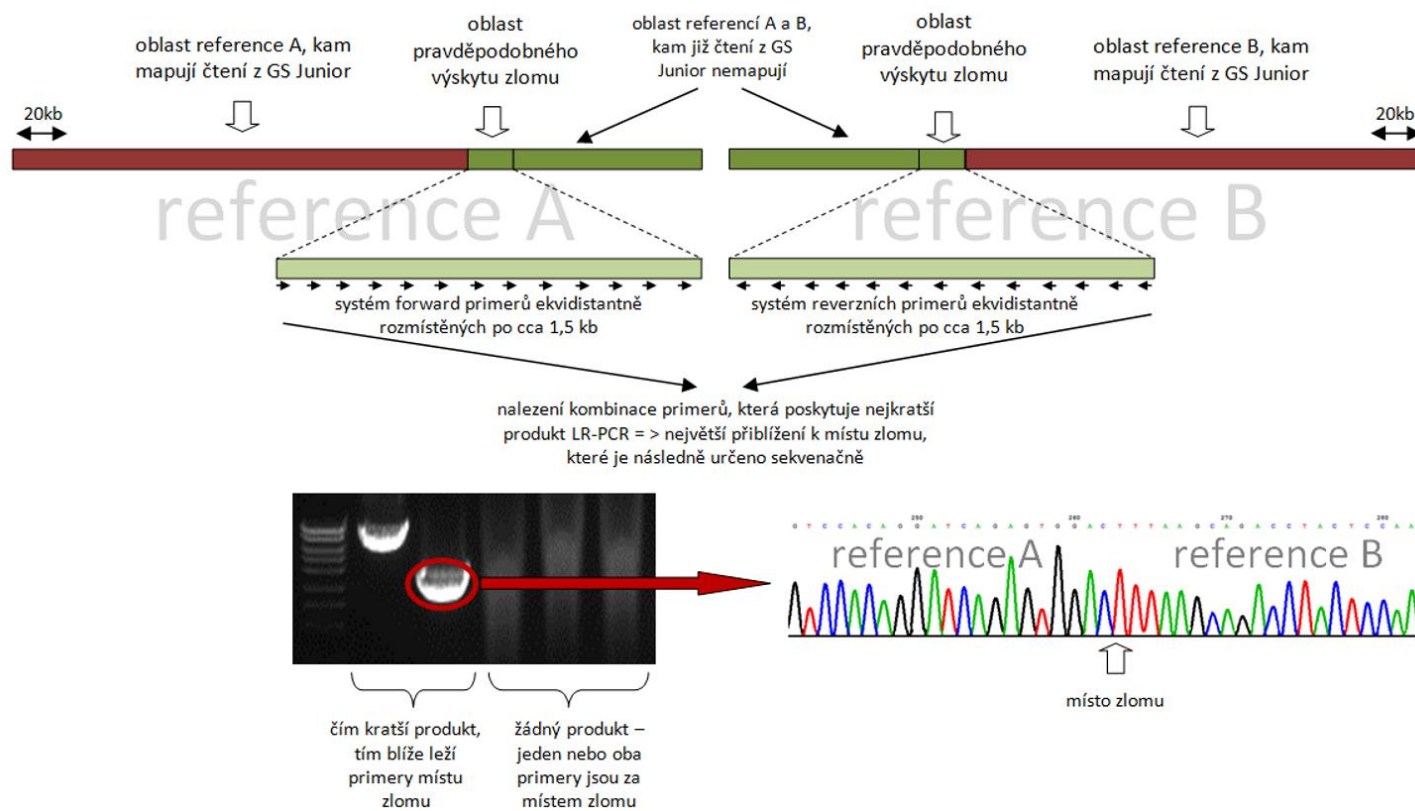
3.2.12 Počítačový program BreakLoc

K identifikaci zlomových míst na derivovaných chromozomech byl naší laboratoří vyvinut počítačový program BreakLoc (Plachý, nepublikováno), který umožňuje jednotlivá čtení („reads“) mapovat na referenční sekvence chromozomů (verze sestavení Genome Reference Consortium Human Build 38). Jako hlavní algoritmus pro určení homologie tento program využívá BLAST+ (verze 2.2.26). Hlavním úkolem řídicí aplikace je shromažďovat získané informace o homologii a pozici jednotlivých mapovaných čtení na referenční sekvenci. Software umožňuje nastavit celou řadu parametrů důležitých pro srovnání čtení s referencí tak, aby využitelnost získaných čtení

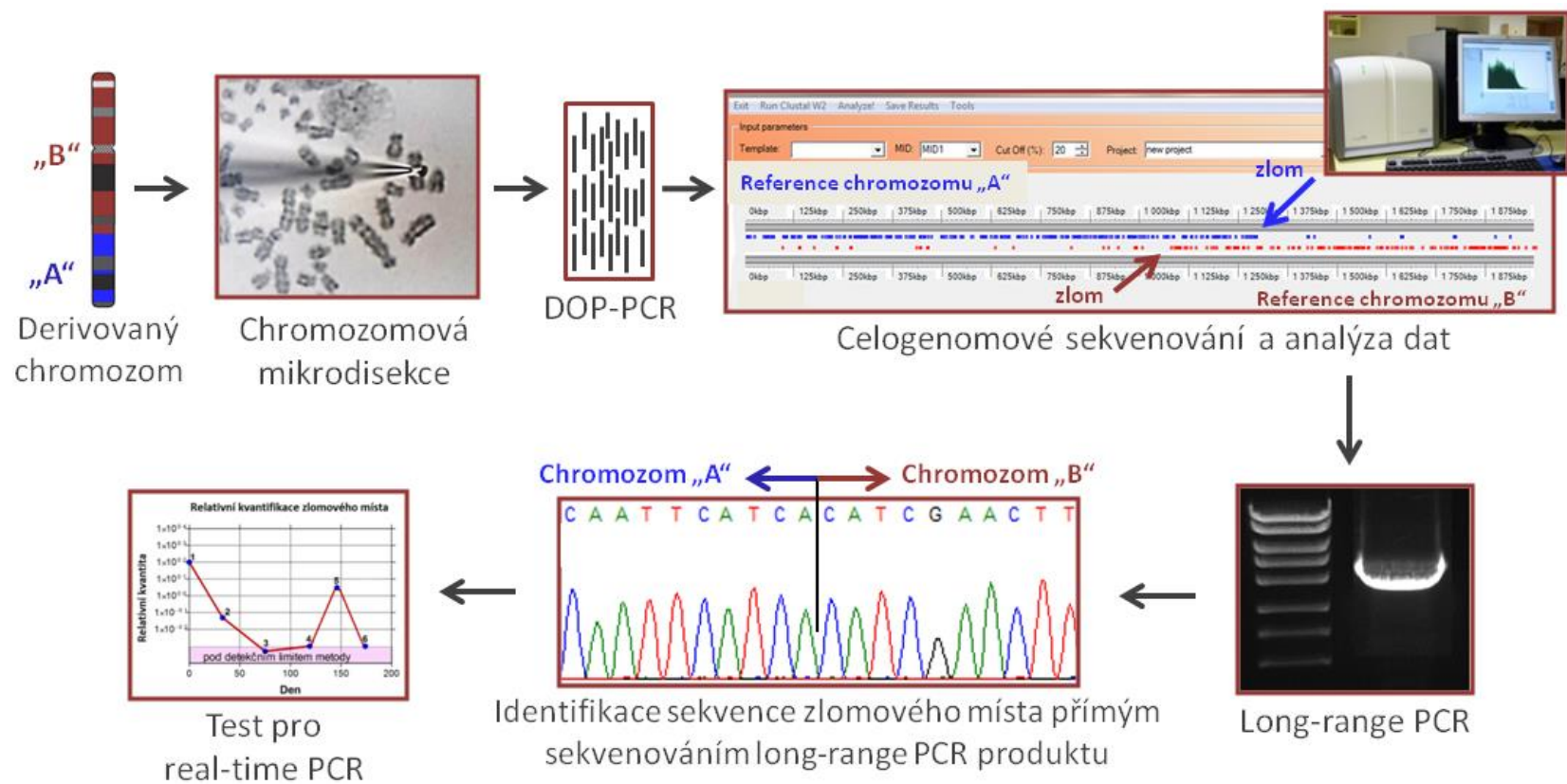
z přístroje GS Junior byla maximální, ale při tom, aby nedocházelo k falešně pozitivním přiřazením.

3.3 Obecný postup

Přístup k identifikaci nukleotidových sekvencí zlomových míst derivovaných chromozomů spočíval v izolaci zlomových oblastí pomocí konvenční mikrodisekce skleněnou jehlou. Takto izolované chromozomové fragmenty byly dále amplifikovány pomocí DOP-PCR a sekvenovány na platformě NGS (GS Junior). Vzniklá čtení byla pomocí počítačového programu BreakLoc přiřazena k referenčním sekvencím konkrétních chromozomů. Do oblasti posledního mapovaného čtení byla ekvidistantně (přibližně po 1,5 kbp) navrhnutá sada primerů pro long-range PCR (Obrázek 3.3). Vzniklý amplicon byl poté sekvenován z obou stran standardní Sangerovou metodou na kapilárním sekvenátoru. Sekvenační analýza následně identifikovala sekvenci DNA zlomových oblastí konkrétní aberace. Na tuto sekvenci byly dále navrženy primery a sonda pro real-time PCR, čímž bylo umožněno kvantifikovat chromozomovou aberaci nalezenou v záchytu onemocnění. Hlavní kroky této strategie jsou znázorněny na Obrázku 3.4.



Obrázek 3.3: Schématické zobrazení postupu při návrhu primerů pro long-range PCR.

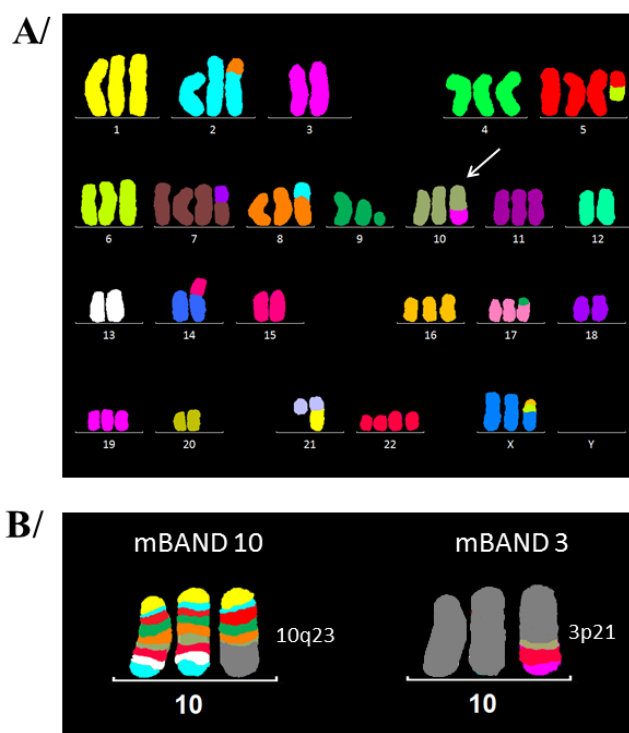


Obrázek 3.4: Hlavní kroky k identifikaci nukleotidové sekvence chromozomových zlomů

4 Výsledky

4.1 Buněčná linie K562

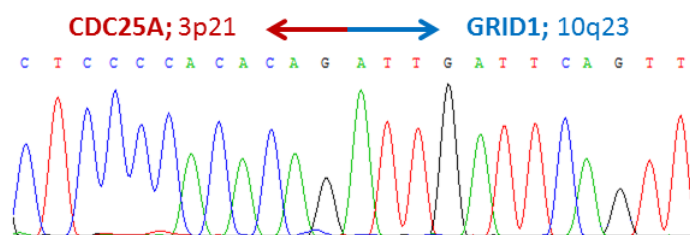
Metodami mFISH a mBAND jsme u buněčné linie K562 identifikovali hypotriploidní karyotyp s přítomností derivovaného chromozomu - der(10)t(3;10)(p21;q23) (Obrázek 4.1). Část derivovaného chromozomu 10 obsahující materiál chromozomů 3 a 10 byla disekována. Celkem bylo disekováno 10 zlomových fragmentů der(10), které byly amplifikovány pomocí DOP-PCR. Pomocí NGS sekvenování bylo získáno 80 789 čtení, která byla přiřazena k referenčním sekvencím chromozomů 3 a 10. Následná long-range PCR vedla k zisku produktu o velikosti ~ 4,5 kbp. Tento amplikon byl poté sekvenován z obou stran standardní Sangerovou metodou a byli identifikováni fúzní partneři, gen *CDC25A* na chromozomu 3 (místo zlomu v intronu 2) a *GRID1* na chromozomu 10 (místo zlomu v intronu 4) (Obrázek 4.2).



Obrázek 4.1: Molekulárně-cytogenetická analýza buněčné linie K562.

A/ mFISH analýza zachycující aberantní karyotyp; šipka označuje derivovaný chromozom 10, který byl disekován

B/ mBAND analýzy pro chromozomy 3 a 10 prokazující zlomy v oblastech 3p21 a 10q23



Obrázek 4.2: Buněčná linie K562. Nukleotidová sekvence chromozomového zlomu. Výsledek sekvenace long-range PCR produktu pomocí Sangerova sekvenování; identifikace fúze genů *CDC25A* (3p21) a *GRID1* (10q23).

4.2 Pacienti s AL

Pro pacienty s AL byl použit postup optimalizovaný u linie K562. Celkem jsme analyzovali 7 pacientů (1 pacient s ALL, 6 pacientů s AML). Zlomové místo a následné sledování MRN pomocí pacient-specifického testu bylo umožněno u 5ti z nich (pacienti 1-5). U zbylých 2 pacientů (pacienti 6 a 7) nebyla identifikace sekvence DNA chromozomových zlomů možná.

Ověření specifity testu pro sledování MRN bylo provedeno pomocí směsné DNA negativních kontrol. Senzitivita analýzy byla stanovena desítkovým ředěním DNA z období diagnózy onemocnění.

U dvou pacientů (pacienti 1 a 2) byl pomocí systému AcutePlexX CE nalezen fúzní transkript, ale jeho exprese nebyla dostačující k senzitivnímu sledování MRN (tzn. v rozsahu alespoň 4 řádů). U pacienta 1 byl identifikován fúzní transkript KMT2A-AFF1 (MLL-AF4), který umožnil sledovat MRN na úrovni RNA s citlivostí 10^{-3} , a který také sloužil k porovnání nově identifikovaných cílů se standardně vyšetřovaným cílem. U pacienta 2 byl pomocí AcutePlexX identifikován fúzní transkript KMT2A-MLLT10 (MLL-AF10) a jeho exprese umožnila sledovat MRN jen v rozsahu 2 řádů.

Screening genových mutací (resp. genových přestaveb u pacienta 1) byl u všech pacientů negativní. Celkový přehled výsledků jednotlivých analýz podává Tabulka 4.1.

Pacient	Pohlaví /Věk	Diagnóza	Karyotyp	Screening ¹⁾
1	Ž/64	ALL	46,XX,t(X;4;11)(q25;q21;q23)[20]	KMT2A-AFF1 ²⁾
2	M/21	AML	46,XY,ins(10;11)(p12;q13q23),der(11)t(11;14)(q13;q11), der(14)t(11;14)(q23;q11)[20]	KMT2A-MLLT10 ³⁾
3	M/72	AML	46,XY,der(7)del(7)(p21)del(7)(q21),t(7;8)(q21;q24)[20]	negativní
4	Ž/57	AML	46,XX,t(3;10)(q26;q21)[18]/46,XX[2]	negativní
5	Ž/67	AML	46,XX,t(3;6)(q26;q25)[20]	negativní
6	M/57	AML	46,XY,del(9)(q12q22)[20]	negativní
7	Ž/64	AML	44,XX,der(2)(11pter→11p11::6q14→6q22::2p11→2q12: :2q33→2q22::2p16→2p22::11q13→11q14::5q23→5qter ,der(5)(5pter→5q15::6p24→6p21::6q24→6q25::2p23→ 2pter),-6,del(7)(pter→q22:),-11[20]	negativní

Ž – žena; M – muž; uveden věk v době diagnózy leukémie

¹⁾ Screening v době záchytu leukémie zahrnoval:

u AML: detekci fúzních transkriptů (AcutePlexX) a genových mutací (NPM1, FLT3-ITD, KMT2A-PTD, CEBPA, WT1, c-KIT)

u ALL: detekci fúzních transkriptů (AcutePlexX) a genových přestaveb (IgH/TCR)

²⁾ cíl KMT2A-AFF1 byl využit pro srovnání s nově identifikovaným cílem

³⁾ cíl KMT2A-MLLT10 byl nedostatečně exprimován

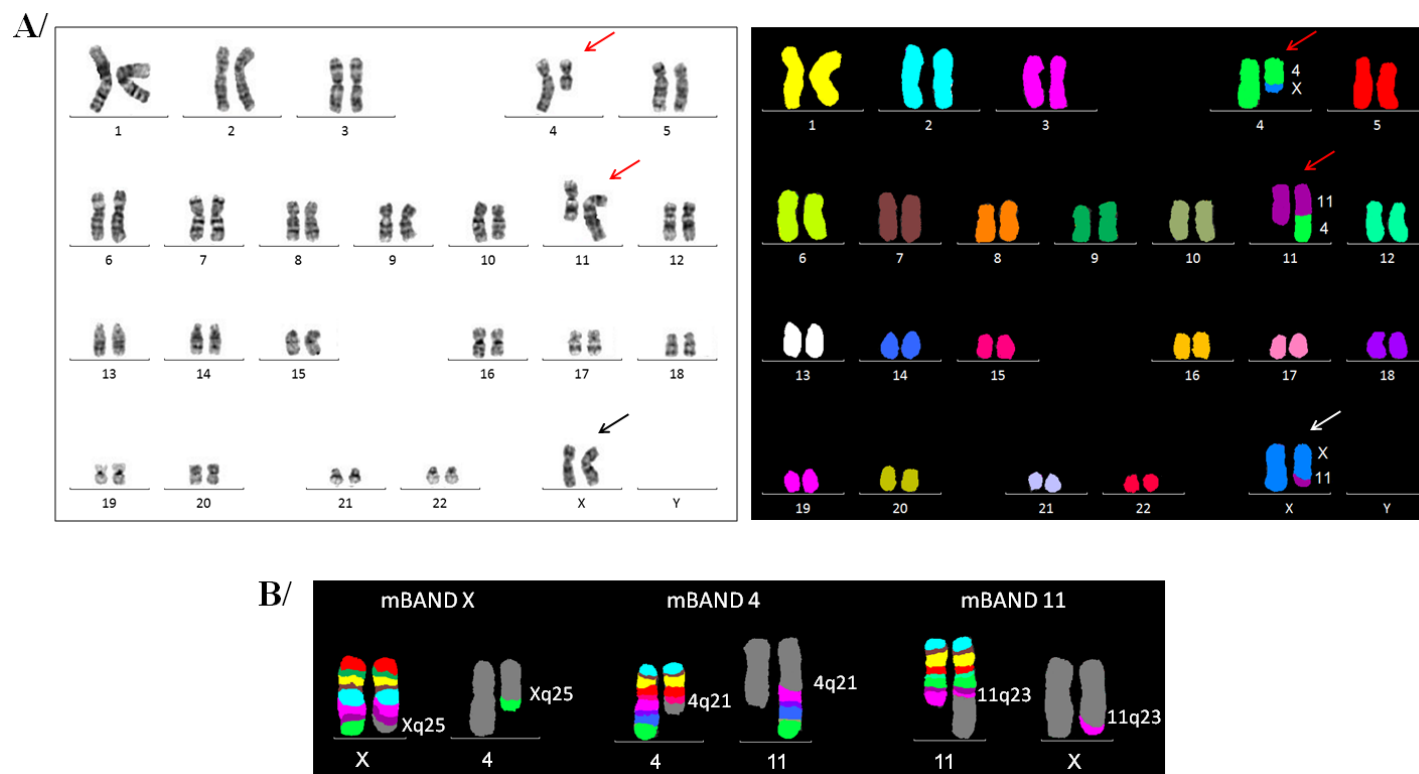
Tabulka 4.1: Přehled výsledků cytogenetických, molekulárně-cytogenetických a molekulárně-biologických vyšetření všech pacientů.

U pacientů 1 – 4, 6 a 7 byla provedena cytogenetická a molekulárně-cytogenetická analýza karyotypu (pruhování chromozomů a mFISH). U pacienta 5 byla provedena analýza karyotypu jen pomocí mFISH, klasickou cytogenetickou analýzu nebylo možné provést z důvodu malého množství materiálu a nízké kvality chromozomů.

K upřesnění lokalizace zlomových míst aberovaných chromozomů bylo použito mnohobarevné pruhození s vysokou rozlišovací schopností (mBAND). K potvrzení aberací zahrnujících geny *KMT2A* (*MLL*) a *MECOM* (*EVII*) byla použita lokus-specifická FISH.

Pacient 1 – srovnání cílů pro sledování MRN

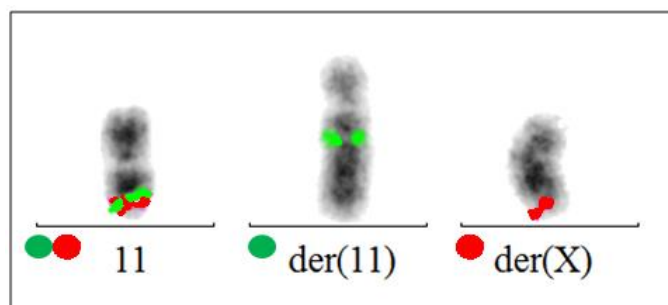
Pacientem 1 byla žena s diagnózou ALL (věk v době diagnózy = 64 let). V karyotypu byla nalezena balancovaná chromozomová translokace – t(X;4;11)(q25;q21;q23) (Obrázek 4.3). Lokus-specifickou sondou bylo potvrzeno, že translokace zahrnuje gen *KMT2A* (Obrázek 4.4). Pomocí real-time PCR (AcutePlexX) a následnou sekvenční analýzou byla detekována přítomnost fúzního transkriptu KMT2A-AFF1. Kvantifikace tohoto cíle sloužila ke srovnání s nově identifikovanými cíli (zlomová místa na derivovaném chromozomu 4 a 11).



Obrázek 4.3: Pacient 1. Analýza karyotypu.

A/ G-pruhování (levá část obrázku) a mFISH (pravá část obrázku) zachycující aberantní karyotyp s $t(X;4;11)$; šípky označují derivované chromozomy; červené šípky označují chromozomy, které byly disekovány

B/ mBAND pro chromozomy X, 4 a 11 potvrzující zlomy v oblastech Xq25, 4q21 a 11q23



Obrázek 4.4: Pacient 1. FISH s lokus-specificickou sondou pro gen *KMT2A*.

Zeleně – 5' konec genu *KMT2A*

Červeně – 3' konec genu *KMT2A*

Identifikace zlomu v genu *KMT2A*. Na chromozomu 11 pozorován fúzní signál (červený + zelený) indikující intaktní chromozom 11, na der(11) a der(X) pozorovány oddělené signály indikující přestavbu genu *KMT2A*.

Derivované chromozomy 4 a 11 byly izolovány mikrodisekcí. Od každého derivovaného chromozomu bylo disekováno 10 fragmentů. Pro kontrolu úspěšnosti mikrodisekce byly amplifikované chromozomové fragmenty fluorescenčně značeny a hybridizovány na metafázní chromozomy periferní krve negativní kontroly (Obrázek 4.5). Sekvenací disekovaných chromozomových fragmentů bylo získáno 122 279, resp. 120 209 čtení pro chromozomy der(4), resp. der(11). Počty získaných čtení a disekovaných chromozomových fragmentů u jednotlivých pacientů a buněčné linie K562 jsou uvedeny v Tabulce 4.2.

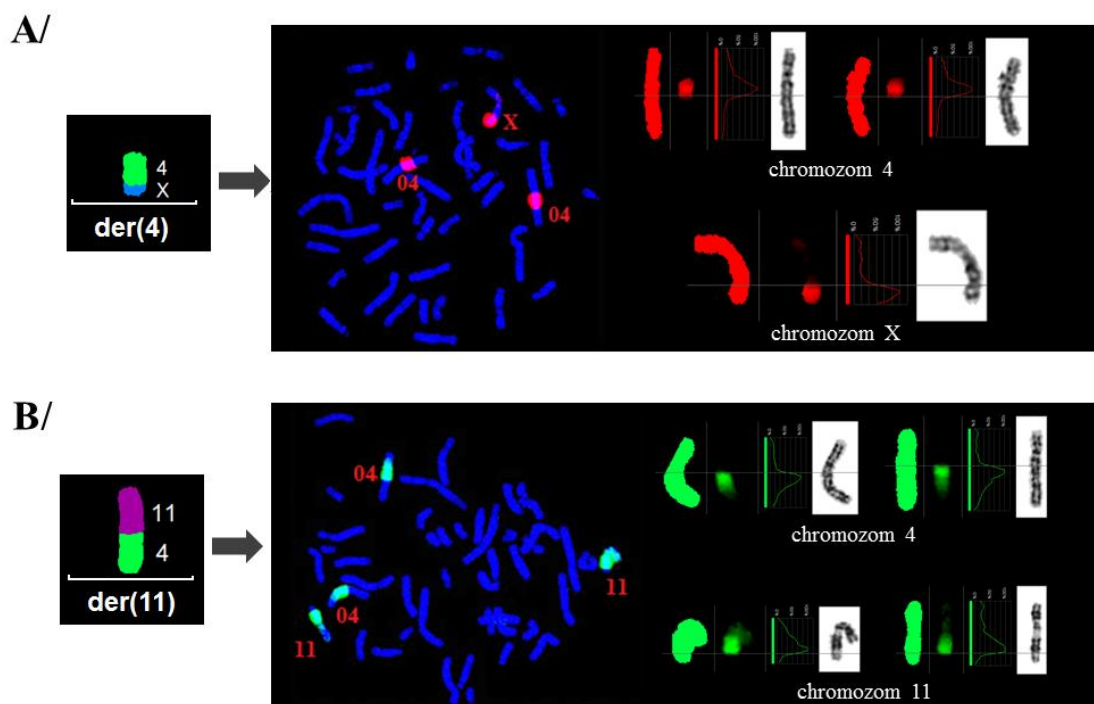
Pacient	Pohlaví /Věk	Disekovaný chromozom	Počet disekovaných fragmentů	Počet získaných čtení
linie K562	-	der(10)	10	80 789
1	Ž/64	der(4)	10	122 279
		der(11)	10	120 209
2	M/21	der(10)	6	149 021
3	M/72	der(8)	10	168 071
4	Ž/57	der(10)	10	81 753
5	Ž/67	der(3)	7	133 754
6	M/57	der(9)	8	100 954
7	Ž/64	der(5)	10	126 670

Ž – žena

M – muž

Uveden věk v době diagnózy leukémie

Tabulka 4.2: Základní informace o mikrodisekci a sekvenaci disekovaného materiálu.



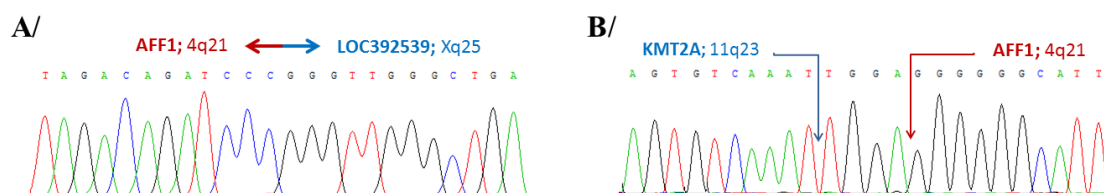
Obrázek 4.5: Pacient 1. Reverzní FISH.

Ověření specifity disekovaných chromozomových fragmentů hybridizací na chromozomy negativní kontroly.

A/ Prokázáno, že derivovaný chromozom 4, tvořený materiálem chromozomů 4 a X, hybridizuje k chromozomům X a 4

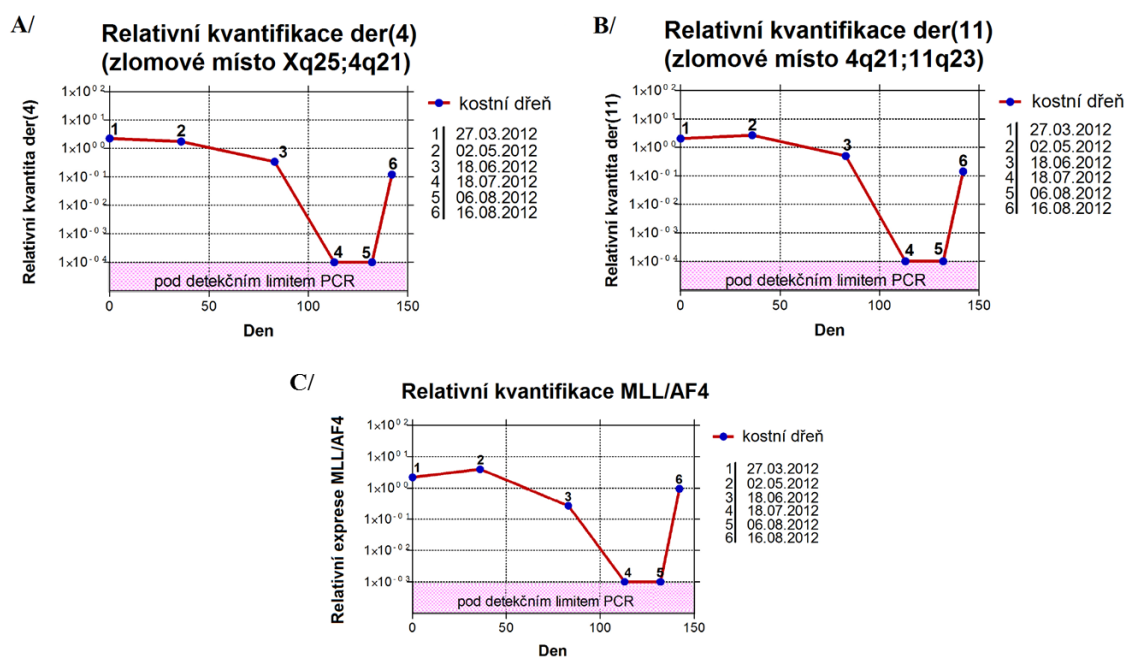
B/ Prokázáno, že derivovaný chromozom 11, tvořený materiálem chromozomů 11 a 4, hybridizuje k chromozomům 11 a 4

Čtení z GS Junior byla mapována k referenčním sekvencím chromozomů 4 a X, resp. 4 a 11. Do oblasti posledních mapovaných čtení byly navrženy primery pro long-range PCR amplifikaci, která vedla k zisku produktů o velikostech ~ 0,5 kbp pro derivovaný chromozom 4, resp. ~ 3 kbp pro derivovaný chromozom 11. Sekvenováním těchto produktů jsme identifikovali DNA sekvence chromozomových zlomů a fúzní partnery. Derivovaný chromozom 4 vznikl fúzí pseudogenu *LOC392539* z chromozomu X a genu *AFF1* na 4q21. Derivovaný chromozom 11 vznikl fúzí genů *KMT2A* (11q23) a *AFF1* (4q21) - Obrázek 4.6.



Obrázek 4.6: Pacient 1. Nukleotidová sekvence zlomů derivovaných chromozomů. Výsledek sekvenace long-range PCR produktů pomocí Sangerova sekvenování.
 A/ derivovaný chromozom 4 – identifikace fúzních partnerů *AFF1*(4q21) a *LOC392539* (Xq25)
 B/ derivovaný chromozom 11 – identifikace fúze genů *KMT2A* (11q23) a *AFF1* (4q21)

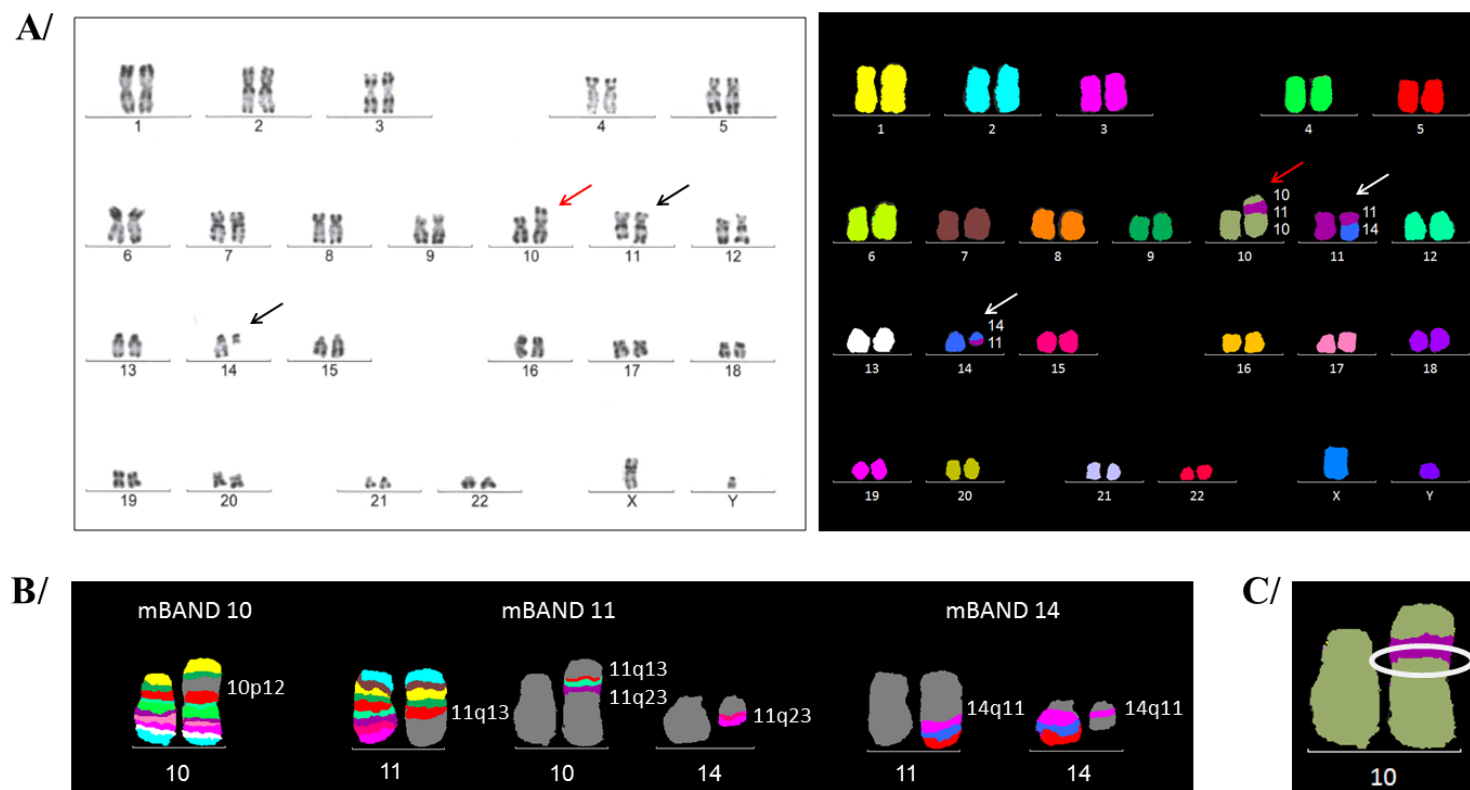
Návrh testů pro real-time PCR poté umožnil kvantifikaci nově identifikovaných cílů (zlomy derivovaných chromozomů 4 a 11 - zlomová místa Xq25;4q21, resp. 4q21;11q23), a také srovnání s již zavedeným cílem pro sledování MRN (fúzní transkript *KMT2A-AFF1*) (Obrázek 4.7).



Obrázek 4.7: Pacient 1. Kvantifikační grafy. Srovnání nově vytvořených testů pro zlomová místa derivovaných chromozomů 4 a 11 – A/ a B/ a testu ke kvantifikaci fúzního transkriptu *KMT2A-AFF1* (MLL-AF4) – C/. Vedle grafů jsou uvedena data odběrů vzorků kostní dřeně.

Pacient 2

Pacientem 2 byl muž s AML (věk v době diagnózy 21 let). Pomocí AcutePlexX byl nalezen fúzní transkript KMT2A-MLLT10 (Tabulka 4.1). Z důvodu nízké exprese tohoto fúzního transkriptu nebylo možné senzitivně sledovat MRN. Proto bylo žádoucí identifikovat DNA sekvenci chromozomového zlomu a navrhnout na ni test. Cytogenetickou a molekulárně-cytogenetickou analýzou byl identifikován komplexní karyotyp, a také potvrzena balancovaná přestavba genu *KMT2A*. Pomocí mBAND analýz byla upřesněna zlomová místa derivovaných chromozomů a oblast, která zahrnuje fúzi KMT2A-MLLT10, a která byla disekována (Obrázky 4.8 a 4.9). Sekvenační analýzou byla identifikována sekvence chromozomového zlomu der(10) – Obrázek 4.10. Finální test pro real-time PCR umožnil kvantifikovat buňky nesoucí derivovaný chromozom 10 v průběhu léčby pacienta (Obrázek 4.11).

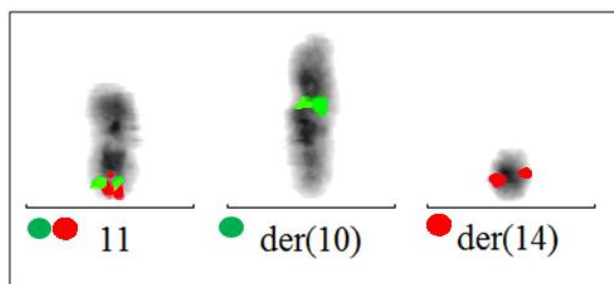


Obrázek 4.8: Pacient 2. Analýza karyotypu.

A/ R-pruhování (levá část obrázku) a mFISH (pravá část obrázku) zachycující aberantní karyotyp; šipky označují derivované chromozomy; červené šipky označují chromozom, který byl disekován

B/ mBAND pro chromozomy 10, 11 a 14 potvrzující zlomy v oblastech 10p12, 11q13, 11q23 a 14q11

C/ výřez z mFISH - kroužkem je zvýrazněna oblast, která byla disekována (zahrnuje region 11q23 a 10p12)

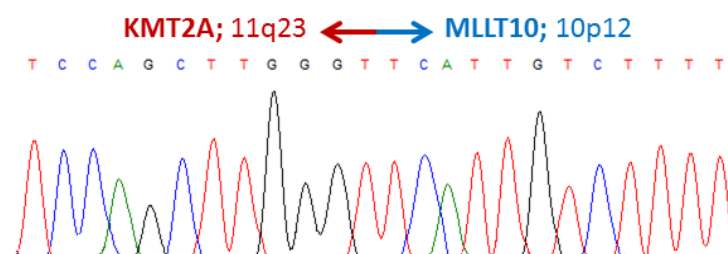


Obrázek 4.9: Pacient 2. FISH s lokus-specifickou sondou pro gen *KMT2A*.

Zeleně – 5' konec genu *KMT2A*

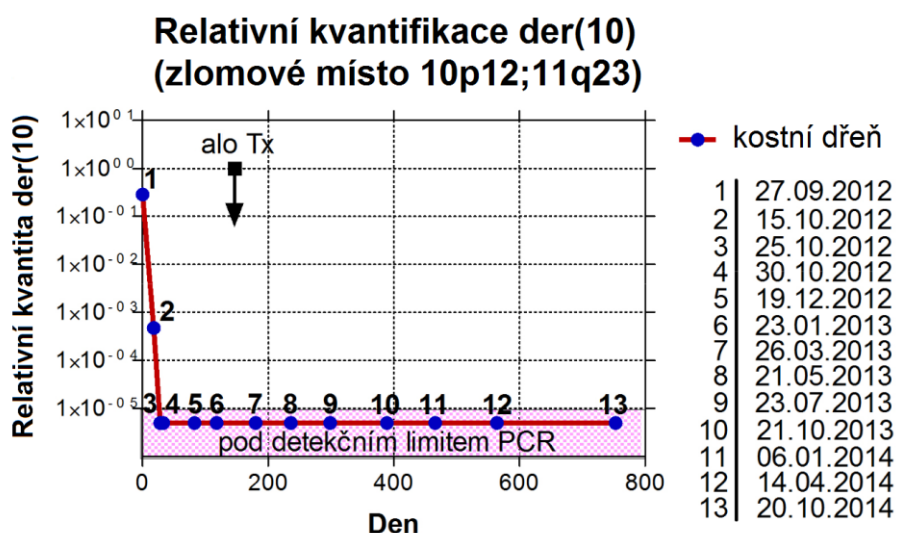
Červeně – 3' konec genu *KMT2A*

Identifikace zlomu v genu *KMT2A*. Na chromozomu 11 pozorován fúzní signál (červený + zelený) indikující intaktní chromozom 11, na der(10) a der(14) pozorovány oddělené signály indikující přestavbu genu *KMT2A*.



Obrázek 4.10: Pacient 2. Nukleotidová sekvence chromozomového zlomu.

Výsledek sekvenace long-range PCR produktu pomocí Sangerova sekvenování; identifikace fúze genů *KMT2A* (11q23) a *MLLT10* (10p12).



Obrázek 4.11: Pacient 2. Kvantifikační graf.

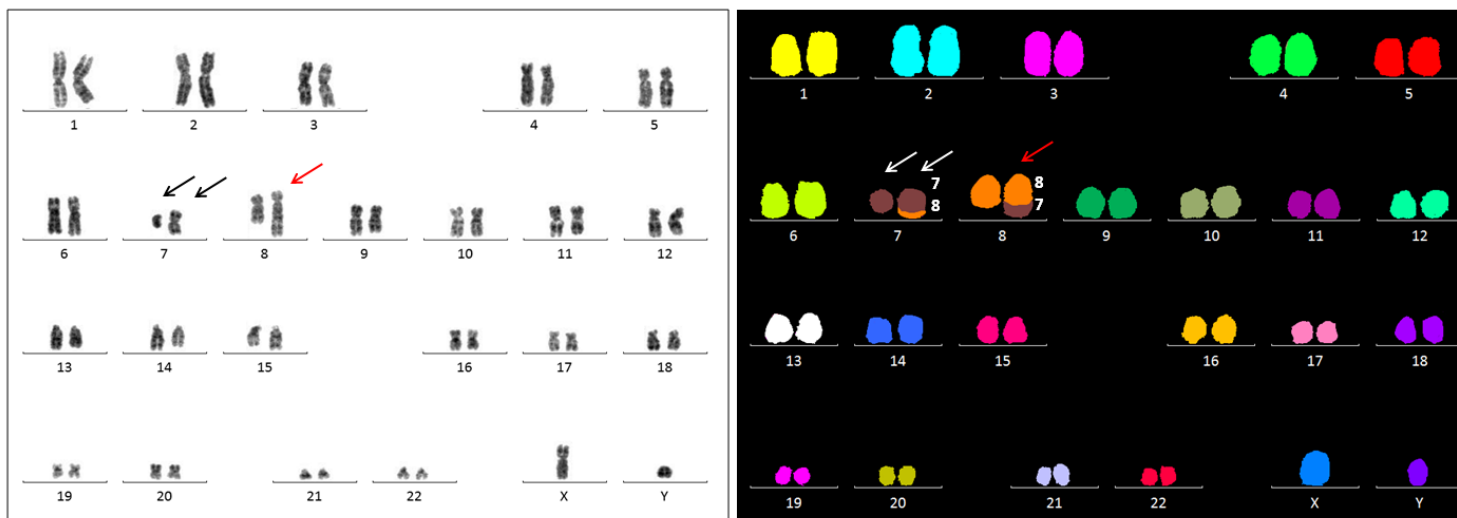
Relativní kvantifikace chromozomového zlomu na der(10). Vedle grafu jsou uvedena data odběrů vzorků kostní dřeně.

Alo Tx – alogenní transplantace

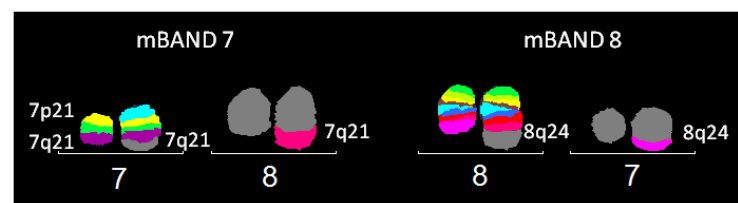
Pacient 3

Analýzou karyotypu pacienta 3 (věk v době diagnózy = 72 let) byla potvrzena přítomnost balancované reciproké translokace $t(7;8)(q21;q24)$ – Obrázek 4.12. Základní screening (AcutePlexX CE a genové mutace) byl negativní a MRN u tohoto pacienta nemohla být sledována. Pro účely identifikace unikátního markeru byla disekována zlomová oblast na derivovaném chromozomu 8 a následná analýza odhalila nejen sekvenci DNA, ale také fúzního partnera $der(8)$ – gen *CDK6* (Obrázek 4.13). Nukleotidová sekvence byla využita k návrhu specifického testu pro real-time PCR (Obrázek 4.14).

A/



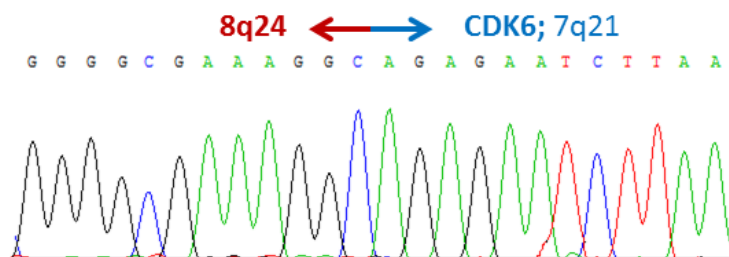
B/



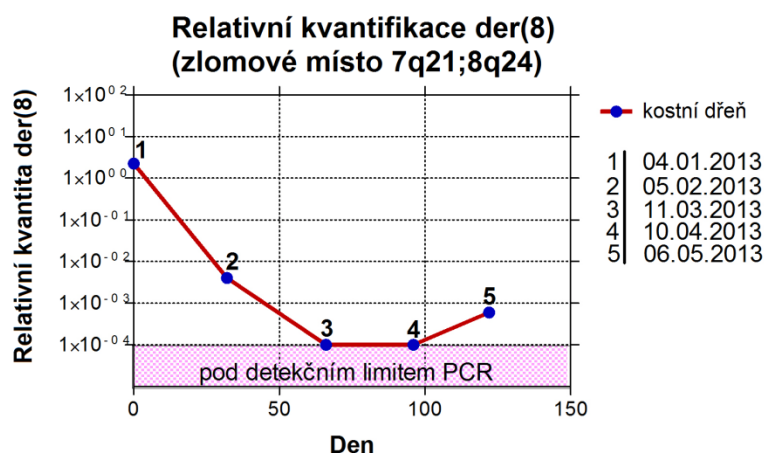
Obrázek 4.12: Pacient 3. Analýza karyotypu.

A/ G-pruhování (levá část obrázku) a mFISH (pravá část obrázku) zachycující aberantní karyotyp; šipky označují derivované chromozomy; červené šipky označují chromozom, který byl disekován

B/ mBAND pro chromozomy 7 a 8 potvrzující zlomy v oblastech 7q21 a 8q24, resp. 7p21



Obrázek 4.13: Pacient 3. Nukleotidová sekvenace chromozomového zlomu. Výsledek sekvenace long-range PCR produktu pomocí Sangerova sekvenování; identifikace fúze genu *CDK6* (7q21) a intergenové oblasti 8q24.

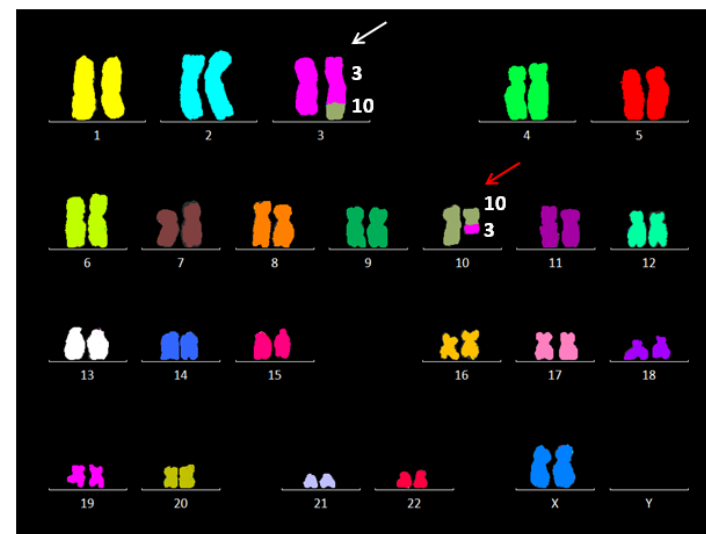


Obrázek 4.14: Pacient 3. Kvantifikační graf. Relativní kvantifikace chromozomového zlomu na der(8). Vedle grafu jsou uvedena data odběrů vzorků kostní dřeně.

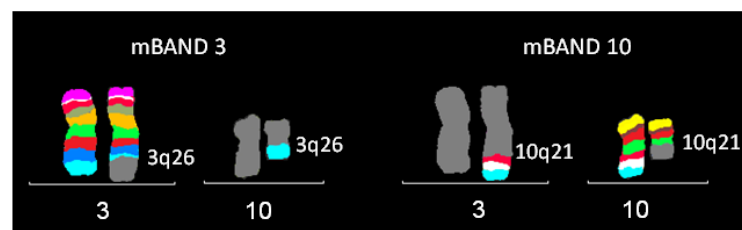
Pacient 4

Pacientem 4 byla žena s AML (věk v době diagnózy = 57 let). Molekulárně-cytogenetickou analýzou byl identifikován karyotyp s balancovanou translokací zahrnující gen *MECOM* – 46,XX,t(3;10)(q26;q21) (Obrázky 4.15 a 4.16). Derivovaný chromozom 10 byl dále mapován na nukleotidovou úroveň a byl identifikován fúzní partner genu *MECOM* – gen *C10orf107* v oblasti 10q21. Sekvence poté sloužila ke sledování MRN v průběhu léčby pacienta (Obrázky 4.17 a 4.18).

A/



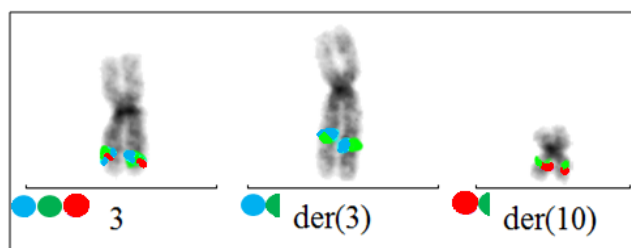
B/



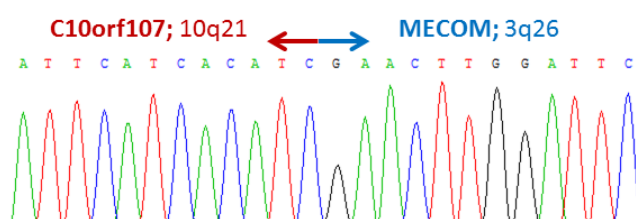
Obrázek 4.15: Pacient 4. Analýza karyotypu.

A/ G-pruhování (levá část obrázku) a mFISH (pravá část obrázku) zachycující aberantní karyotyp s $t(3;10)$; šipky označují derivované chromozomy; červené šipky označují chromozom, který byl disekován

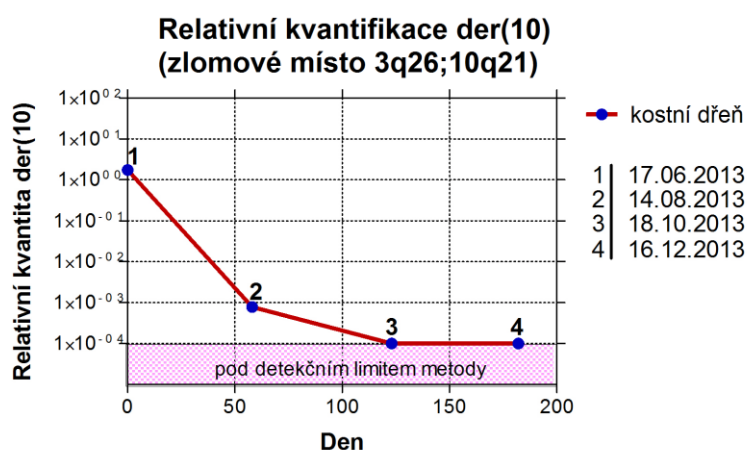
B/ mBAND pro chromozomy 3 a 10 potvrzující zlomy v oblastech 3q26 a 10q21



Obrázek 4.16: Pacient 4. FISH s lokus-specifickou sondou pro gen *MECOM*. Identifikace zlomu v genu *MECOM*. Na chromozomu 3 pozorován fúzní signál (modrý + zelený + červený) indikující intaktní chromozom 3, na der(3) a der(10) pozorován oddělený signál indikující přestavbu genu *MECOM*.



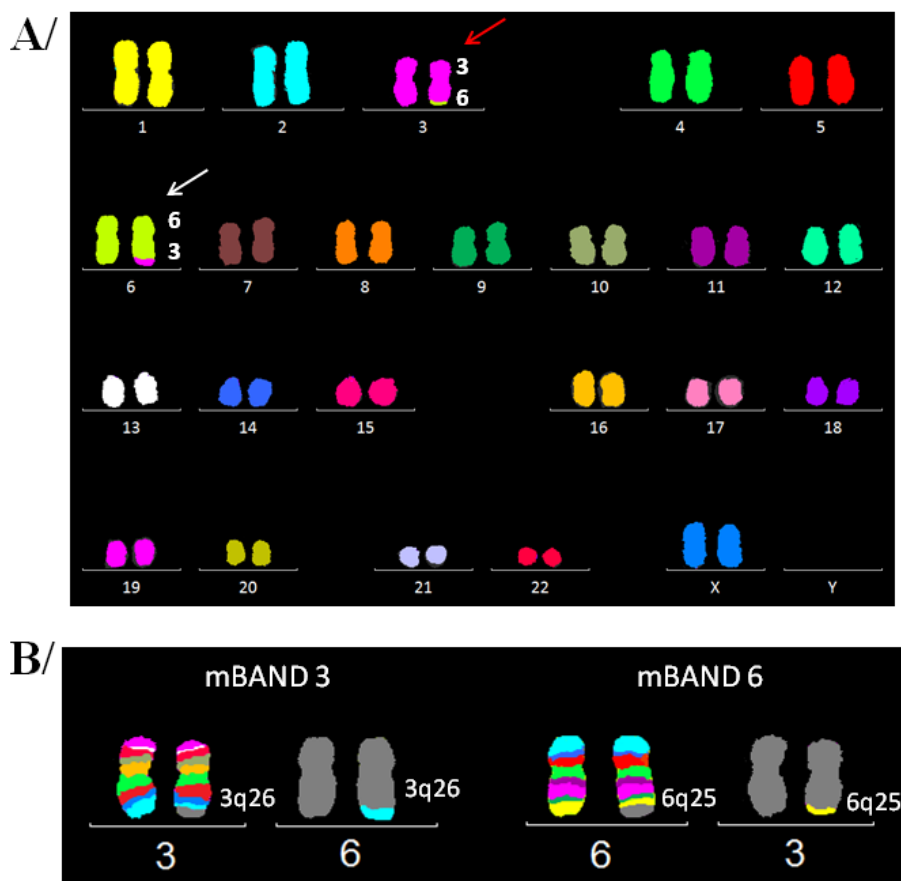
Obrázek 4.17: Pacient 4. Nukleotidová sekvenace chromozomového zlomu. Výsledek sekvenace long-range PCR produktu pomocí Sangerova sekvenování; identifikace fúze genů *C10orf107* (10q21) a *MECOM* (3q26).



Obrázek 4.18: Pacient 4. Kvantifikační graf. Relativní kvantifikace chromozomového zlomu na der(10). Vedle grafu jsou uvedena data odběrů vzorků kostní dřeně.

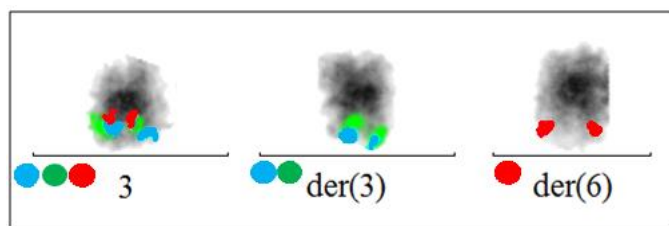
Pacient 5

Pacientem 5 byla žena s AML (věk v době diagnózy = 67 let). Vyšetření karyotypu odhalilo balancovanou translokaci – $t(3;6)(q26;q25)$. Pomocí lokus-specifické sondy pro oblast 3q26 bylo potvrzeno, že translokace zahrnuje gen *MECOM* (Obrázky 4.19 a 4.20). Pro účely identifikace molekulárního markeru pro sledování MRN byl mikrodisekcí izolován derivovaný chromozom 3 a následným mapováním na nukleotidovou úroveň byli identifikováni fúzní partneři z oblasti 3q26 - *MECOM* a z oblasti 6q25 - *LOC101928923* (Obrázky 4.21 a 4.22).

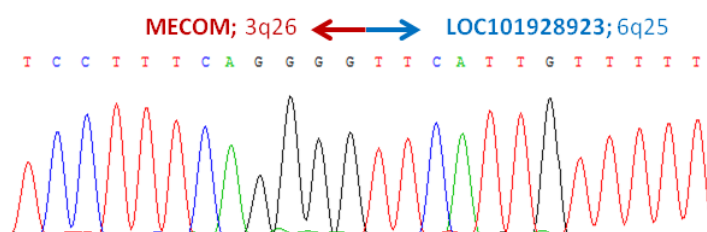


Obrázek 4.19: Pacient 5. Analýza karyotypu.

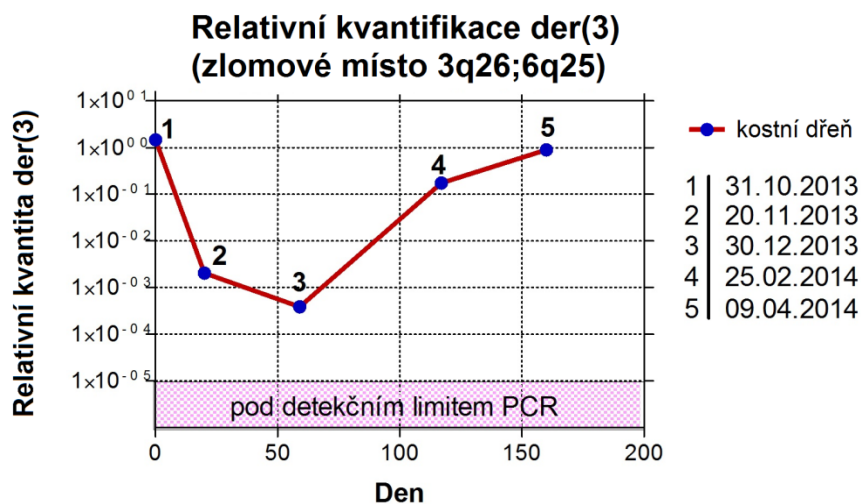
A/ mFISH prokazující aberantní karyotyp s přítomností $t(3;6)$; šipky označují derivované chromozomy; červená šipka označuje chromozom, který byl disekován
B/ mBAND pro chromozomy 3 a 6 prokazující zlomy v oblastech 3q26 a 6q25



Obrázek 4.20: Pacient 5. FISH s lokus-specifickou sondou pro gen *MECOM*. Identifikace zlomu v genu *MECOM*. Na chromozomu 3 pozorován fúzní signál (modrý + zelený + červený) indikující intaktní chromozom 3, na der(3) a der(6) pozorován oddělený signál indikující přestavbu genu *MECOM*.



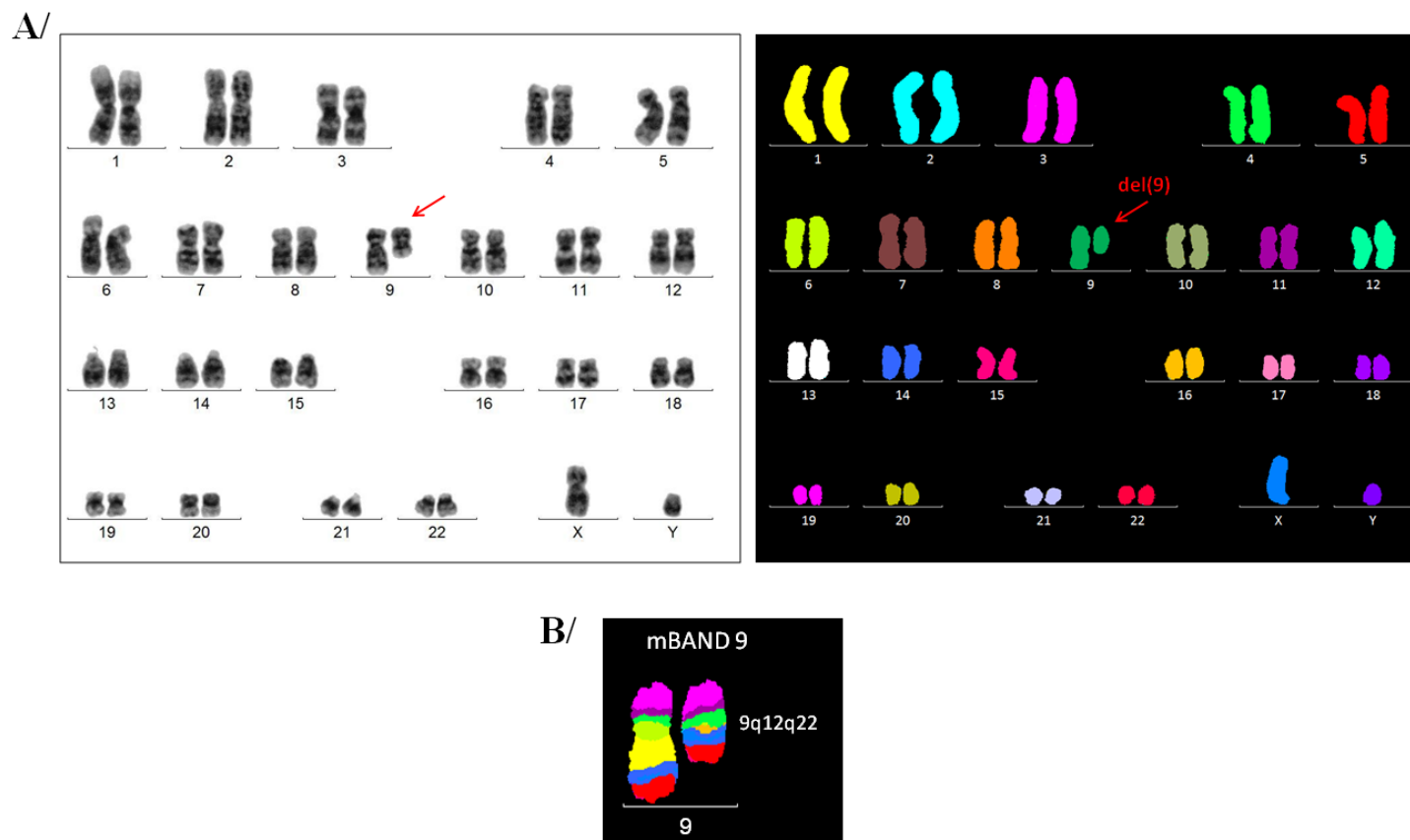
Obrázek 4.21: Pacient 5. Nukleotidová sekvence chromozomového zlomu. Výsledek sekvenace long-range PCR produktu pomocí Sangerova sekvenování; identifikace fúzních partnerů *MECOM* (3q26) a *LOC101928923* (6q25).



Obrázek 4.22: Pacient 5. Kvantifikační graf. Relativní kvantifikace chromozomového zlomu na der(3). Vedle grafu jsou uvedena data odběrů vzorků kostní dřeně.

Pacient 6

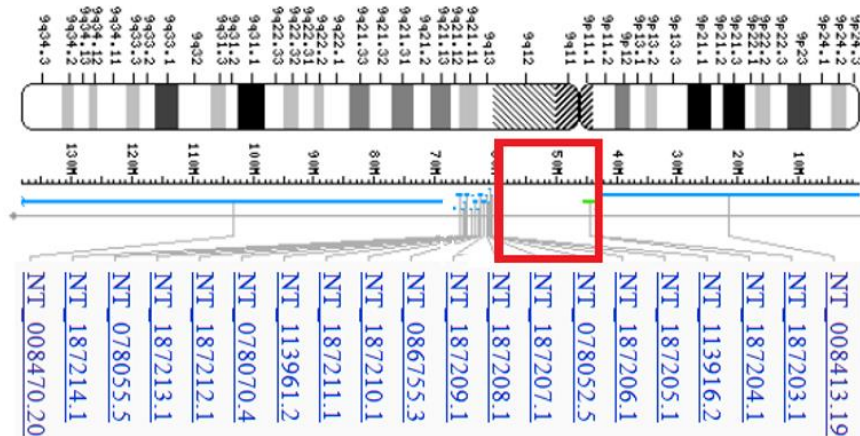
Pacientem 6 byl muž se sekundární AML (věk v době diagnózy sekundární AML = 57 let). Analýzou karyotypu byla identifikována intersticiální delece chromozomu 9 – del(9)(q12q22). Zlomové místo bylo dále upřesněno pomocí mBAND (Obrázek 4.23). Deletovaný chromozom 9 byl disekován a následnými analýzami bylo zjištěno, že zlom se nachází v heterochromatinové oblasti, která nemá potřebné pokrytí referencemi. Heterochromatinová oblast zlomu dlouhého ramene chromozomu 9 (~ 9q12) proto nebyla stanovena (Obrázek 4.24). Zlom v distální části chromozomu 9q byl pomocí počítačového programu BreakLoc určen a nachází se v pruhu 9q22.3. Sekvence DNA chromozomového zlomu tedy nebyla identifikována a u pacienta nebylo možné sledovat MRN.



Obrázek 4.23: Pacient 6. Analýza karyotypu.

A/ G-pruhování (levá část obrázku) a mFISH (pravá část obrázku) zachycující aberantní karyotyp s del(9q); červené šipky označují chromozom, který byl disekován

B/ mBAND pro chromozom 9 potvrzující intersticiální delecii oblasti q12-q22



Obrázek 4.24: Pokrytí chromozomu 9 referenčními sekvencemi.

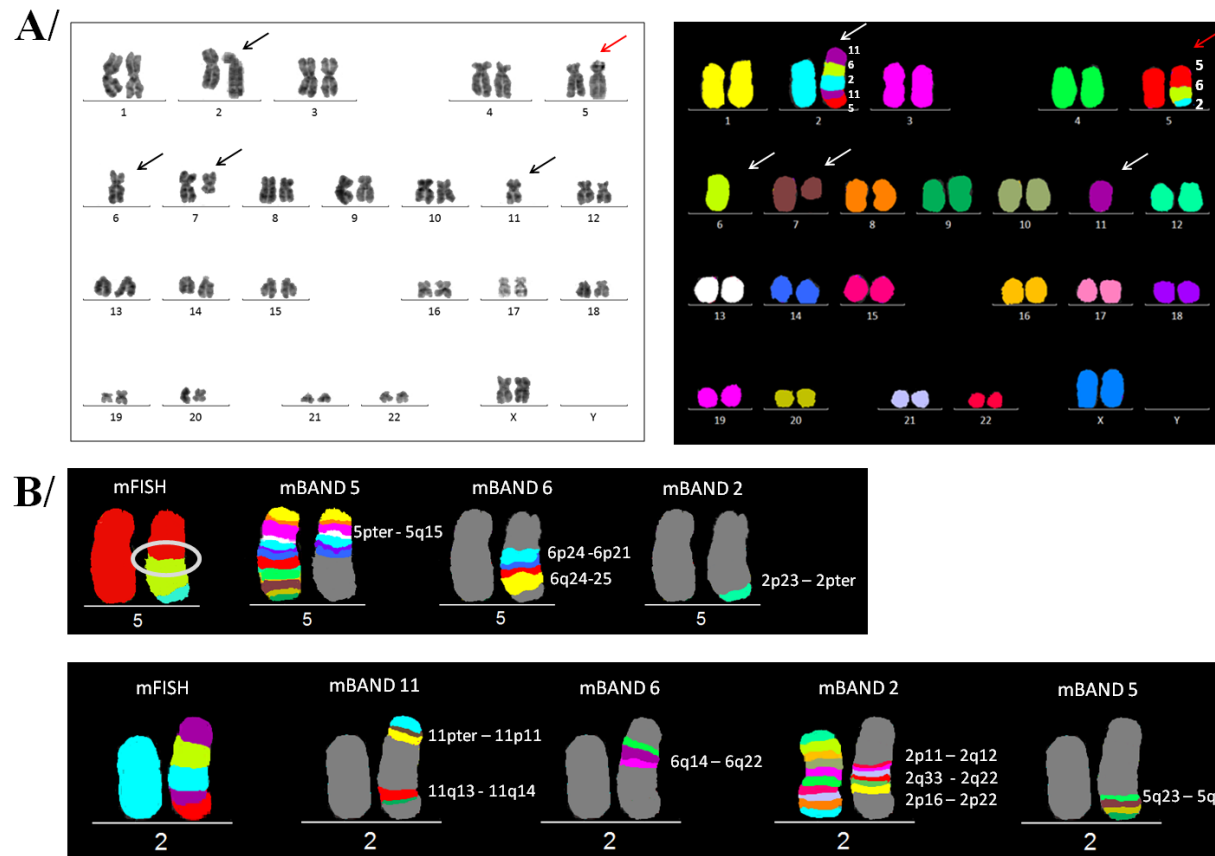
V červeném rámečku je vyznačena oblast 9p11-q12, která nemá potřebné pokrytí referencemi.

Převzato z

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=9606&build=106.0&chr=9>;
stav k lednu 2015

Pacient 7

Pacientem 7 byla žena s AML (věk v době diagnózy = 64 let). Pomocí mFISH jsme u této pacientky našli komplexní karyotyp s přítomností derivovaných chromozomů 2 a 5. Derivovaný chromozom 5 se skládal z materiálu chromozomů 5, 6 a 2. Mikrodisekcí byla izolována oblast obsahující zlomové místo chromozomů 5 a 6 (Obrázek 4.25). Analýzou sekvenačních dat byla potvrzena přítomnost čtení nejen z chromozomů 5 a 6, ale také z chromozomu 4, který se ale dle molekulárně-cytogenetických analýz přestaveb neúčastnil, což znemožnilo identifikovat sekvenci zlomu. U pacienta 7 tudíž nebylo možné identifikovat molekulární marker pro sledování MRN.



Obrázek 4.25: Pacient 7. Analýza karyotypu.

A/ G-pruhování (levá část obrázku) a mFISH (pravá část obrázku) zachycující aberantní karyotyp; šipky označují derivované chromozomy, resp. monozomii chromozomů 6 a 11; červené šipky označují chromozom, který byl disekován

B/ mBAND pro chromozomy 5, 6 a 2 u der(5) – kroužkem je vyznačena oblast, která byla disekována; mBAND pro chromozomy 11, 6, 2 a 5 pro der(2)

5 Diskuze

Kvantifikace MRN pomocí technik založených na PCR je pro pacienty s AL nezávislým prognostickým faktorem. Zavedením těchto metod do klinické praxe je možné sledovat dynamiku maligní populace buněk v odpovědi na léčbu pacienta a případně včas zachytit počínající relaps onemocnění. Z tohoto důvodu má sledování MRN v průběhu léčby pacientů nesporný klinický význam (Campana 2004; Kern *et al.*, 2005; Brüggemann *et al.* 2006; Szczepański 2007; Kern *et al.* 2008; Campana 2010; Schnittger *et al.*, 2003; Weisser *et al.* 2005; Candoni *et al.* 2011; Abdelhamid *et al.* 2012; Buccisano *et al.* 2012; Miyazaki *et al.* 2012; Hourigan a Karp 2013; Garand *et al.* 2013). K detekci MRN se u dospělých pacientů s ALL nejčastěji využívají klonální přestavby genů pro těžký imunoglobulinový řetězec nebo T-buněčný receptor. Dále můžeme MRN detekovat pomocí fúzních transkriptů, např. BCR-ABL1 nebo KMT2A-AFF1 (MLL-AF4). U dospělých pacientů s AML slouží jako cíl pro sledování MRN rekurentní cytogenetické aberace (resp. fúzní transkripty, které z nich vznikají – např. RUNX1-RUNX1T1, PML-RARA...), a také klonálně specifické mutace prognostických markerů asociovaných s leukémiemi (např. *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3-ITD*...). V naší laboratoři slouží k detekci fúzních transkriptů unikátní diagnostický systém AcutePlexX CE, díky kterému jsme schopni detekovat více než 100 známých fúzních transkriptů a jejich sestřihových variant (Tabulka 1.7). Mutace genů a genové přestavby detekujeme pomocí konvenční PCR s následným sekvenováním vzniklého produktu. Uvedenými přístupy identifikujeme cíl pro sledování MRN přibližně u 90 % dospělých pacientů s ALL a pouze u 50 % dospělých pacientů s AML.

Nezbytnou součástí vyšetření pacientů s AL je analýza karyotypu. Umožňuje určit, příp. zpřesnit diagnózu a prognózu nemocných. Klasické cytogenetické vyšetření není ale dostatečně senzitivní k detekci zbytkových leukemických buněk, a navíc je ovlivněno ziskem adekvátního počtu analyzovatelných metafází. Molekulárně-cytogenetické vyšetření pomocí FISH je sice citlivější (10^{-2}), nezávislé na proliferčním potenciálu buněk a umožňuje analyzovat větší počet buněk než je tomu u klasické cytogenetiky, nicméně, pro účely stanovení MRN není ani tato senzitivita dostatečná. Nedílnou součástí diagnostického procesu u pacientů s AL je také imunofenotypizační analýza

exprese CD antigenů na leukemických blastech. Vyšetření pomocí průtokové cytometrie je důležité nejen při stanovení diagnózy, ale také k monitorování účinnosti léčby a stanovení prognózy onemocnění. Nicméně, pro účely senzitivní detekce MRN může být využití průtokové cytometrie limitováno jednak nestabilitou imunologických profilů leukemických buněk v průběhu léčby, a také nižší senzitivitou (ve srovnání s PCR technikami), která se pohybuje mezi 10^{-3} - 10^{-4} , v závislosti na typu leukémie, použitém přístrojovém vybavení a detekčním panelu protilátek (Szczepański 2007; Jorgensen a Chen 2011; Miyazaki *et al.* 2012; Brüggemann *et al.* 2012). Z tohoto důvodu je nesrovnatelně vhodnější a citlivější metodika založená na real-time PCR, která obvykle dosahuje senzitivity 10^{-4} - 10^{-6} (Hokland *et al.* 2011; Jorgensen a Chen 2011).

Z uvedených důvodů bylo cílem dizertační práce připravit flexibilní metodiku k identifikaci nových klonálně specifických znaků leukemických buněk, a to zejména pro pacienty s AML, u kterých nelze pomocí běžného screeningového panelu analýz v záchytu onemocnění nalézt molekulární marker pro senzitivní sledování MRN pomocí real-time PCR. S využitím cytogenetických, molekulárně-cytogenetických a molekulárně-biologických technik (pruhování chromozomů, mFISH/mBAND, mikrodisekce chromozomů, sekvenování nové generace, Sangerovo sekvenování, long-range PCR, real-time PCR) jsme připravili pacient-specifický test pro real-time PCR, který umožňuje monitorovat chromozomovou aberaci diagnostikovanou v záchytu onemocnění s citlivostí až 10^{-5} .

Základním předpokladem k úspěšné identifikaci sekvence DNA chromozomového zlomu je přesná charakterizace derivovaného chromozomu. Klasická karyotypová analýza je limitována morfologií chromozomů a zejména rozlišením, které dosahuje 7-10 Mbp (Bickmore 2001). Proto se nám osvědčilo analyzovat karyotyp, resp. derivovaný chromozom pacientů nejen pomocí klasických pruhovacích technik, ale také pomocí technik molekulární cytogenetiky – mFISH, mBAND, příp. BAC-FISH, které poskytují rozlišení 2-3 Mbp, resp. 1-1,5 Mbp, resp. ~ 100 kbp (Mundle a Koska 2006). Díky těmto metodám můžeme vyloučit chromozomové aberace, které nejsou vhodné k mikrodisekci. Například, u některých pacientů s AL může dojít k fúzi

telomerické oblasti jednoho chromozomu a „non-telomerické“ oblasti druhého chromozomu. Takto vzniklý derivovaný chromozom není vhodné disekovat, protože repetitivní povaha telomery neumožňuje finální návrh testu pro real-time PCR (Jones *et al.* 2012).

V práci byl použit přístup izolace derivovaného chromozomu pomocí mikrodisekce. Tato metodika se běžně využívá k přípravě chromozomově specifických DNA knihoven, malovacích sond, a také k identifikaci marker chromozomů (Engelen *et al.* 1998; Shim *et al.* 2007). Předpokladem pro úspěšnou disekci je přítomnost dobře rozestoupených metafázních chromozomů a jejich rozlišení na základě klasických barvicích technik (barvení Giemsou, G-pruhování), příp. pomocí fluorescenčních sond (Engelen *et al.* 1998; osobní sdělení - prof. Thomas Liehr, Universitätsklinikum Jena, Německo). Mikrodisekce probíhá na vzorcích nakapaných na krycí skla, která mají jiné vlastnosti než klasická podložní skla používaná pro cytogenetické a molekulárně-cytogenetické techniky. Navíc jsou chromozomy získané ze vzorků kostní dřeně obvykle v horší kvalitě než je tomu u vzorků periferní krve, a proto se na krycích sklech pruhují a rozpoznávají obtížněji než na podložních sklech. Z těchto důvodů jsme aberované chromozomy všech pacientů (a buněčné linie K562) rozlišovali pomocí fluorescenčních sond, které byly vždy zvoleny tak, abychom byli schopni jasně poznat derivovaný chromozom. Osvědčilo se nám kombinovat komerční centromerické sondy a „MCB“ sondy z knihovny prof. Liehra.

Laserová mikrodisekce sice umožňuje rychlou a precizní disekci cílového chromozomu bez kontaminace nebo poškození genetického materiálu, nicméně pro účely izolace intersticiálních částí chromozomu nemusí být příliš vhodná (osobní sdělení - Dr. Anya Hunt, MMI, Švýcarsko). Proto jsme v naší práci zvolili konvenční mikrodisekci s použitím skleněné jehly ovládané elektronicky řízeným mikromanipulátorem. Navíc, ve srovnání s laserovou mikrodisekcí je konvenční mikrodisekce finančně dostupnější pro rutinní využití v laboratorní praxi (Grossmann *et al.* 2010). K izolaci derivovaných chromozomů může být použita i průtoková cytometrie, ale tento přístup je závislý na velikosti chromozomů, a proto nemusí být vždy s úspěchem využit, navíc neumožňuje studium invertovaných chromozomů (Chen *et al.* 2008). Podobně jako při použití laserového mikrodisektoru, průtokovou cytometrií není možné separovat specifické intersticiální fragmenty derivovaných chromozomů. Pořízení

průtokového cytometru vybaveného třídícím je velmi nákladnou investicí, což také limituje jeho použití ve standardní laboratoři.

Disekované fragmenty chromozomů byly dále amplifikovány a sekvenovány na platformě GS Junior (Roche). Chen *et al.* ve své studii popisuje použití celogenomového sekvenátoru Illumina 1G (Solexa), který v průběhu jedné analýzy dokáže získat až miliony čtení o průměrné délce ~ 200 bp (Chen *et al.* 2008, Chen *et al.* 2010). Námi použitý systém GS Junior sice poskytuje přibližně sto tisíc čtení, ale medián jejich délky je ~ 400 bp, což umožňuje preciznější mapování repetitivních sekvencí, čímž stoupá využitelnost jednotlivých čtení.

Fúzní gen KMT2-AFF1 (MLL-AF4) je u pacientů s ALL častým nálezem a u naprosté většiny z nich vzniká balancovanou reciprokou translokací t(4;11)(q21;q23). Nicméně, byly popsány i další mechanismy vzniku fúze genů *KMT2A* a *AFF1*, např. komplexní translokace, inserce a kryptické přestavby (Kowarz *et al.* 2007). U pacienta 1 jsme našli vzácnou, dosud nepublikovanou (Mitelman *et al.* 2014) translokaci, které se účastní tři chromozomy (tzv. „three-way translocation“) - Obrázek 4.3. „Three-way“ translokace byly také popsány u několika dalších klasických aberací, např. t(9;22) a t(15;17) (Park *et al.* 2009; Kato *et al.* 2009). Navíc, detekce fúzního transkriptu KMT2-AFF1 pomocí PCR technik umožňuje u těchto pacientů sledovat MRN. U našeho pacienta 1 mělo vyšetření založené na kvantifikaci fúzního transkriptu citlivost přibližně 10^{-3} (Obrázek 4.7 C). Pomocí zde prezentovaného přístupu byl umožněn i návrh dalších testů pro real-time PCR, které jsou založeny na DNA sekvenci zlomů derivovaných chromozomů 4 a 11. Jejich kvantifikace byla porovnána s kvantifikací fúzního transkriptu KMT2-AFF1. Toto srovnání jasně ukazuje, že nově identifikované molekulární markery mohou být využity ke sledování MRN u pacientů s AL. Navíc nové testy umožnily sledovat MRN s vyšší senzitivitou než při využití fúzního transkriptu KMT2A-AFF1 (Obrázek 4.7).

U pacienta 2 byl pomocí systému AcutePlexX CE identifikován fúzní transkript KMT2A-MLLT10 (MLL-AF10). Geny *KMT2A* a *MLLT10* jsou transkripčně opačně orientovány a jednoduchá reciproká translokace t(10;11) by vedla ke vzniku fúzního genu složeného z 5' částí obou genů (na chromozomu 11). Vznik funkčního fúzního transkriptu KMT2A-MLLT10 proto vyžaduje nejméně tři chromozomové zlomy. Bylo popsáno několik různých mechanismů

vedoucích ke vzniku KMT2A-MLLT10. Patří mezi ně např. paracentrická inverze oblasti 11q13-q23 (zahrnující gen *KMT2A*), nebo naopak inverze části genu *MLLT10*, následovaná translokací na 10p12, resp. na chromozom 11 (11q23). Případně může dojít k inzerci 5' konce genu *KMT2A* do oblasti 10p12, resp. k inzerci 10p do 11q (van Limbergen *et al.* 2002; Matsuda *et al.* 2006). Pozorovány byly také kryptické inserce 5' konce genu *KMT2A* (Klaus *et al.* 2003). Podobné komplexní chromozomové přestavby s opačně orientovanými geny byly popsány i u solidních nádorů (Ewingův sarkom) nebo i dalších typů leukémií, např. fúze genů *ETV6* a *ABL1* u chronické myeloidní leukémie (Klaus *et al.* 2003). U pacienta 2 bylo molekulárně-cytogenetickými analýzami (mFISH, lokus-specifická FISH a mBAND) potvrzeno, že došlo k inzerci 5' části genu *KMT2A* do oblasti 10p12 a 3' část genu *KMT2A* byla translokována na derivovaný chromozom 14 (Obrázky 4.8 a 4.9). Na úrovni fúzního transkriptu (úroveň RNA) byla tato přestavba velmi nízkě exprimovaná, a tudíž neumožňovala senzitivně (v rozsahu alespoň 4 řádů) sledovat MRN. Proto bylo nutné kvantifikovat tuto aberaci na úrovni DNA. Identifikace zlomových míst v genu *KMT2A* je možná několika způsoby. Meyer *et al.* využívá přístup založený na inverzní long-distance PCR. Principem je naštěpení DNA pacienta pomocí restričního enzymu a následná ligace kohezních konců. Vzniklá cirkulární DNA je poté amplifikována pomocí specifických primerů pro gen *KMT2A*. Výsledkem je identifikace pacient-specifické fúzní sekvence, a tedy i partnerského genu (Meyer *et al.* 2005). Nicméně, úspěšnost tohoto přístupu závisí na distribuci restričních míst a formaci cirkulární DNA o takové velikosti, která je vhodná pro následnou PCR amplifikaci. Zde popsáný přístup, založený na mikrodisekci, není na těchto faktorech závislý a u pacienta 2 tak umožnil identifikaci nukleotidové sekvence zlomového místa na der(10) a návrh specifického testu pro sledování MRN. Další možností, jak identifikovat zlomová místa na úrovni DNA, je využití long-range PCR z intronových oblastí. U tohoto přístupu je nutné znát sekvenci fúzního transkriptu (RNA úroveň) a do přilehlých intronů (tzn. již na DNA úrovni) navrhnout kombinace primerů vždy z genu *KMT2A* (např. forward primery) a partnerského genu (např. reverzní primery). Tento přístup je však velmi pracný, jelikož zlomy jsou lokalizovány v intronech, které jsou mnohonásobně delší než exony, a je tedy nutné navrhnout větší počet primerů. U pacienta 2 byl zlom v genu *MLLT10* (*AF10*) přítomen v intronu 8, který má délku přibližně 35 kbp.

Tento přístup může být navíc komplikován přítomností několika sestřihových variant fúzního transkriptu (osobní sdělení – Mgr. Lenka Žejšková, Ph.D., laboratoř synlab genetics). Tuto skutečnost potvrzují i další autoři (Strehl *et al.* 2006).

U pacienta 3 jsme zde popsaným postupem identifikovali chromozomový zlom v oblasti genu pro CDK6 (cyclin-dependent kinase 6). Gen *CDK6* je lokalizován na chromozomu 7 (oblast 7q21) a u některých typů kancerů bývá pozorována jeho zvýšená exprese, která je asociována s chromozomovými přestavbami oblasti 7q21 (Douet-Guilbert *et al.* 2014). CDK6 patří do rodiny serin/threonin proteinových kináz, které mají důležitou roli v řízení buněčného cyklu. Konkrétně CDK6 je důležitá pro řízení postupu G1 fáze, a také řídí přechod z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu. Po aktivaci D cyklinem fosforyluje kináza CDK6 (společně s CDK4) protein RB1, čímž jej inaktivuje a dochází tak k uvolnění transkripčního faktoru E2F z vazby na RB1 protein. E2F se váže na DNA, mění expresi cílových genů, v důsledku čehož buňka vstupuje do S fáze buněčného cyklu (Sherr 2000). Aberací genu *CDK6* může dojít ke ztrátě kontroly nad fyziologickým průběhem buněčného cyklu, což může vést ke vzniku malignit. Bylo prokázáno, že deregulace kinázy CDK6 vede u hematopoetických onemocnění ke stimulaci angiogeneze (Kollmann *et al.* 2013).

U pacientů 4 a 5 byla pomocí FISH s lokus-specifickou sondou nalezena přestavba genu *MECOM*. Tento gen je lokalizován na chromozomu 3q26 a jeho přestavby pozorujeme až u 5 % pacientů s myeloidními malignitami. Bylo popsáno několik partnerů genu *EVII* – např. *CDK6* (7q21), *TRB* (7q34), *ETV6* (12p13) a *RUNX1* (21q22) (Haferlach *et al.* 2012a, Lugthart *et al.* 2010). Významná je také častá aberantní exprese genu *EVII*, která vzniká zejména jako důsledek chromozomových přestaveb, a která je u pacientů s AML spojena se špatnou prognózou (Lugthart *et al.* 2010). Deregulovaná exprese genu *EVII*, případně dalších genů zahrnutých v řízení buněčné proliferace a diferenciace (např. *BAALC*, *WT1* ...), může být využita jako alternativní cíl pro sledování MRN (Weber *et al.* 2014; Weissner *et al.* 2007; Cilloni *et al.* 2009). Nicméně, senzitivita analýz založených na sledování genové exprese vždy závisí na hladině exprese při zachytu onemocnění. Proto jsou tyto analýzy vhodné jen pro pacienty

s vysokou hladinou exprese a i u těchto případů obvykle nedosahují dostatečné citlivosti nutné pro sledování MRN (tzn. alespoň 10^{-4}). Z tohoto důvodu je vždy preferován specifický test založený na sledování fúzních transkriptů a/nebo genových mutací pomocí PCR. Mikrodisekcí aberovaných chromozomů bylo možné u pacientů 4 a 5 identifikovat nukleotidovou sekvenci chromozomových zlomů a pomocí PCR senzitivně sledovat MRN.

U pacienta 4 jsme pomocí cytogenetických technik našli reciprokou translokaci t(3;10)(q26;q21). Dle internetových databází (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology - <http://atlasgeneticsoncology.org>; Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer - <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>; stav k lednu 2015) byla tato translokace popsána jen u jednoho pacienta s AML (Lugthart *et al.* 2010). Podobně u pacienta 5 jsme identifikovali reciprokou translokaci t(3;6)(q26;q25), která byla dosud popsána jen u dvou pacientů s AML (Sinclair *et al.* 2005; Schmidt-Hieber *et al.* 2010). V uvedených publikacích ale nebyli objasněni fúzní partneři těchto translokací. Zde prezentovaným přístupem jsme nejen identifikovali specifické markery pro sledování MRN, ale také jsme popsali dosud nepublikované fúzní partnery genu *MECOM* – u pacienta 4 *C10orf107* v oblasti 10q21 a u pacienta 5 *LOC101928923* na chromozomu 6q25.

Možnou limitací zde popsané metody k identifikaci nových molekulárních markerů je nedostupnost referenční sekvence (verze sestavení Genome Reference Consortium Human Build 38) v místě přechodu jednotlivých kontigů některých chromozomů, zejména pak v repetitivních oblastech centromer a v heterochromatinových oblastech. To byl případ pacienta 6, u kterého jsme identifikovali intersticiální delecí dlouhého ramene chromozomu 9 – del(9)(q12q22). Místo zlomu v oblasti 9q22 bylo domapováno, ale zlom v heterochromatinové oblasti 9q12, která není pokryta referenčními sekvencemi, nebylo možno pomocí našeho přístupu určit.

Další možnou limitací jsou molekulárně komplikované aberace, např. kryptické inserce nebo některé komplexní přestavby. Komplexní karyotyp jsme našli u pacienta 7, u kterého jsme identifikovali dva derivované chromozomy – der(2) a der(5) – Obrázek 4.25. Pro mikrodisekci jsme zvolili derivovaný chromozom 5 (oblast zlomu mezi chromozomy 5 a 6), protože byl tvořen

materiálem pouze ze tří chromozomů - 5, 6 a 2. Na rozdíl od der(2), který byl dle mBAND analýz tvořen mnohem komplexnější přestavbou chromozomů 2p, 2q, 5, 6, 11p a 11q. Analýzou dat získaných sekvenací disekovaných fragmentů der(5) byla nalezena čtení nejen z chromozomů 5 a 6, ale také z chromozomu 4. Pravděpodobně tedy došlo ke kryptické inzerci materiálu chromozomu 4 na der(5), která neumožňovala určit zlomové místo a navrhnout test pro real-time PCR.

Stabilita nově identifikovaného molekulárního markeru v průběhu onemocnění také limituje využití klonálně specifických testů. Z tohoto hlediska volíme pro mikrodisekci takovou chromozomovou aberaci, která je, v případě přítomnosti více klonů v karyotypu pacienta, zastoupena v každém klonu. V případě identifikace několika chromozomových změn disekujeme všechny vhodné aberace (viz der(4) a der(11) u pacienta 1), čímž je zajištěno monitorování MRN pomocí několika nezávislých cílů. U každého pacienta může být stabilita markeru (a to i již zavedeného a rutinně využívaného) ovlivněna klonální evolucí. Z tohoto důvodu je vždy nutná korelace takto získaných výsledků s dalšími klinickými, biochemickými a hematologickými parametry, průtokovou cytometrií a cytogenetickou analýzou.

Pomocí nově navrženého přístupu k identifikaci molekulárních markerů bylo umožněno senzitivně (10^{-4} - 10^{-5}) monitorovat MRN u pacientů 1-5. U pacientů 1 a 2 byla navíc tímto způsobem zvýšena senzitivita PCR testů k detekci fúzí KMT2A-AFF1 (MLL-AF4), resp. KMT2A-MLLT10 (MLL-AF10). U pacientů 1, 3 - 5 jsme identifikovali dosud nepublikované unikátní markery, které umožnily senzitivně sledovat MRN. Navíc jsme u pacientů 4 a 5 popsali dva nové fúzní partnery genu *MECOM* (*C10orf107* a *LOC101928923*).

6 Závěr

Předložená práce popisuje zcela unikátní způsob identifikace molekulárního markeru pro sledování MRN u pacientů s AL. Jedná se o laboratorní přístup „šitý na míru“ nemocných s AL, který naplňuje naši představu o personalizované medicíně.

Zde popsáný přístup kombinuje metody cytogenetiky, molekulární cytogenetiky a molekulární biologie a umožňuje identifikovat nukleotidovou sekvenci zlomů derivovaných chromozomů. V případě, že u nemocného nenalezneme vhodný marker pro kvantifikaci MRN, máme k dispozici precizní postup, který umožní dosud nepopsanou chromozomovou aberaci využít k vytvoření specifického PCR testu pro sledování úspěšnosti léčby pacienta.

V optimálním případě je PCR test na podkladě unikátního klonálně specifického znaku leukemické populace připraven již za 6 týdnů od stanovení diagnózy, což je zcela v souladu s potřebami rutinního diagnostického procesu u pacientů s AL, kdy první vzorky ke sledování MRN dostává laboratoř po doznění indukční terapie, což je přibližně 1 měsíc od záchytu onemocnění.

7 Citovaná literatura

1. Abdelhamid E, Preudhomme C, Helevaut N, Nibourel O, Gardin C, Rousselot P, Castaigne S, Gruson B, Berthon C, Soua Z, Renneville A. Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2012; 36(3):316-23.
2. Abdul-Hamid G. (2011). Classification of Acute Leukemia, Acute Leukemia - The Scientist's Perspective and Challenge, Prof. Mariastefania Antica (Ed.), ISBN: 978-953-307-553-2, InTech, DOI: 10.5772/19848. Available from: <http://www.intechopen.com/books/acute-leukemia-the-scientist-s-perspective-and-challenge/classification-of-acute-leukemia>
3. Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J a kolektiv (2008): Hematologie (2. doplněné a zcela přepracované vydání). Grada. ISBN: 978-80-247-2502-4
4. Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, Lewis I. Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(6):934-45.
5. Aplan PD. Chromosomal translocations involving the MLL gene: molecular mechanisms. *DNA Repair.* 2006;5(9-10):1265-1272.
6. Arai S, Yoshimi A, Shimabe M, Ichikawa M, Nakagawa M, Imai Y, Goyama S, Kurokawa M. Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells. *Blood.* 2011;117(23):6304-14.
7. Asou N. The role of a runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;45(2):129-50.
8. Avvisati G, Lo-Coco F, Paoloni FP, Petti MC, Diverio D, Vignetti M, Latagliata R, Specchia G, Baccarani M, Di Bona E, Fioritoni G, Marmont F, Rambaldi A, Di Raimondo F, Kropp MG, Pizzolo G, Pogliani EM, Rossi G, Cantore N, Nobile F, Gabbas A, Ferrara F, Fazi P, Amadori S, Mandelli F; GIMEMA, AIEOP, and EORTC Cooperative Groups. AIDA 0493 protocol for newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: very long-term results and role of maintenance. *Blood.* 2011;117(18):4716-25.
9. Bacher U, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T. Molecular diagnostics in acute leukemias. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(11):1333-41.
10. Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K, Schiffer CA, Powell BL, Kolitz JE, Moore JO, Stone RM, Davey FR, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease

- detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood*. 2001;97(11):3574-80.
11. Baldus CD, Mrózek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol*. 2007;137(5):387-400.
 12. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardiman JW, Powell BL, Allen SL, Moore JO, Larson RA, Kolitz JE, de la Chapelle A, Bloomfield CD. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1613-8.
 13. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, Slater R, Smit EM, Beverloo HB, Verhoef G, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Sonneveld P, de Greef GE, Löwenberg B, Delwel R. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood*. 2003;101(3):837-845.
 14. Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):532–543.
 15. Ben-Ami O, Friedman D, Leshkowitz D, Goldenberg D, Orlovsky K, Pencovich N, Lotem J, Tanay A, Groner Y. Addition of t(8;21) and inv(16) acute myeloid leukemia to native RUNX1. *Cell Rep*. 2013;4(6):1131-43.
 16. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.
 17. Bickmore WA. Karyotype analysis and chromosome banding. 2001; eLS. disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008;112: 4-16.
 18. Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J, Lüschen S, Pott C, Ritgen M, Scheuring U, Horst HA, Thiel E, Hoelzer D, Bartram CR, Kneba M; German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;107(3):1116-23.
 19. Brüggemann M, Raff T, Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood*. 2012;120(23):4470-81.
 20. Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, Arcese W, Amadori S, Venditti A. Prognostic and therapeutic

- implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;119(2):332-41.
21. Candoni A, Toffoletti E, Gallina R, Simeone E, Chiozzotto M, Volpetti S, Fanin R. Monitoring of minimal residual disease by quantitative WT1 gene expression following reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Clin Transplant*. 2011;25(2):308-16.
 22. Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur DC, Baer MR, Yu F, Knuutila S, Mrózek K, Oberkircher AR, Marcucci G, de la Chapelle A, Elonen E, Block AW, Rao PN, Herzig GP, Powell BL, Ruutu T, Schiffer CA, Bloomfield CD. Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res*. 1998; 58(1):55-9.
 23. Campana D. Minimal residual disease studies in acute leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2004;122 Suppl:S47-57.
 24. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:7-12.
 25. Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A, Menzel C, Ullmann R, Schulz MH, Erdogan F, Li N, Kijas Z, Arkesteijn G, Pajares IL, Goetz-Sothmann M, Heinrich U, Rost I, Dufke A, Grasshoff U, Glaeser B, Vingron M, Ropers HH. Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing. *Genome Res*. 2008;18(7):1143-9.
 26. Chen W, Ullmann R, Langnick C, Menzel C, Wotschofsky Z, Hu H, Döring A, Hu Y, Kang H, Tzschach A, Hoeltzenbein M, Neitzel H, Markus S, Wiedersberg E, Kistner G, van Ravenswaaij-Arts CM, Kleefstra T, Kalscheuer VM, Ropers HH. Breakpoint analysis of balanced chromosome rearrangements by next-generation paired-end sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(5):539-43.
 27. Chiaretti S, Gianfelici V, Ceglie G, Foà R. Genomic Characterization of Acute Leukemias. *Med Princ Pract*. 2014;23(6):1-20.
 28. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, Gottardi E, Fava M, Schnittger S, Weiss T, Izzo B, Nomdedeu J, van der Heijden A, van der Reijden BA, Jansen JH, van der Velden VH, Ommen H, Preudhomme C, Saglio G, Grimwade D. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5195-201.
 29. de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*. 1990;347(6293):558-61.

30. Douet-Guilbert N, Tous C, Le Flahec G, Bovo C, Le Bris MJ, Basinko A, Morel F, De Braekeleer M. Translocation t(2;7)(p11;q21) associated with the CDK6/IGK rearrangement is a rare but recurrent abnormality in B-cell lymphoproliferative malignancies. *Cancer Genet.* 2014;207(3):83-6.
31. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenau P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453-74.
32. Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, Döhner H. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol.* 2002;20(15):3254-61.
33. Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2008;93(7):976-82.
34. Engelen JJ, Albrechts JC, Hamers GJ, Geraedts JP. A simple and efficient method for microdissection and microFISH. *J Med Genet.* 1998;35(4):265-8.
35. Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, Kantarjian HM. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer.* 2010;116(5):1165-76.
36. Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2003;98(7):1337-54.
37. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* 2005;352(3):254-66.
38. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008;111(5):2776-84.
39. Garand R, Beldjord K, Cavé H, Fossat C, Arnoux I, Asnafi V, Bertrand Y, Boulland ML, Brouzes C, Clappier E, Delabesse E, Fest T, Garnache-Ottou F, Huguet F, Jacob MC, Kuhlein E, Marty-Grès S, Plesa A, Robillard N,

- Roussel M, Tkaczuk J, Dombret H, Macintyre E, Ifrah N, Béné MC, Baruchel A. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia*. 2013;27(2):370-6.
40. Ghanem H, Tank N, Tabbara IA. Prognostic implications of genetic aberrations in acute myelogenous leukemia with normal cytogenetics. *Am J Hematol*. 2012;87(1):69-77.
 41. Gleissner B, Rieder H, Thiel E, Fonatsch C, Janssen LA, Heinze B, Janssen JW, Schoch C, Goekbuget N, Maurer J, Hoelzer D, Bartram CR. Prospective BCR-ABL analysis by polymerase chain reaction (RT-PCR) in adult acute B-lineagelymphoblastic leukemia: reliability of RT-nested-PCR and comparison to cytogenetic data. *Leukemia*. 2001;15(12):1834-40.
 42. Graubert TA, Mardis ER. Genomics of acute myeloid leukemia. *Cancer J*. 2011;17(6):487-91.
 43. Gray JX, McMillen L, Mollee P, Paul S, Lane S, Bird R, Gill D, Saal R, Marlton P. WT1 expression as a marker of minimal residual disease predicts outcome in acute myeloid leukemia when measured post-consolidation. *Leuk Res*. 2012;36(4):453-8.
 44. Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, Xiong Y, Tse W. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol*. 2009;2:23.
 45. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, Howe K, Dastugue N, Jansen J, Radford-Weiss I, Lo Coco F, Lessard M, Hernandez JM, Delabesse E, Head D, Liso V, Sainty D, Flandrin G, Solomon E, Birg F, Lafage-Pochitaloff M. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique, Groupe de Français d'Hématologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood*. 2000;96(4):1297-308.
 46. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010b;116(3):354-65.
 47. Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, Nugent EA, Patel Y, Flora R, Diverio D, Jones K, Aslett H, Batson E, Rennie K, Angell R, Clark RE, Solomon E, Lo-Coco F, Wheatley K, Burnett AK. Prospective minimal

- residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27(22):3650-8.
48. Grimwade D, Vyas P, Freeman S. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*, 2010a; 22(6):656-63.
 49. Grossmann V, Höckner M, Karmous-Benailly H, Liang D, Puttinger R, Quadrelli R, Röthlisberger B, Huber A, Wu L, Spreiz A, Fauth C, Erdel M, Zschocke J, Utermann G, Kotzot D. Parental origin of apparently balanced de novo complex chromosomal rearrangements investigated by microdissection, whole genome amplification, and microsatellite-mediated haplotype analysis. *Clin Genet*. 2010;78(6):548-53.
 50. Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB, Kohlmann A, Martelli MP, Kern W, Spanhol-Rosseto A, Klein HU, Dugas M, Schindela S, Trifonov V, Schnittger S, Haferlach C, Bassan R, Wells VA, Spinelli O, Chan J, Rossi R, Baldoni S, De Carolis L, Goetze K, Serve H, Peceny R, Kreuzer KA, Oruzio D, Specchia G, Di Raimondo F, Fabbiano F, Sborgia M, Liso A, Farinelli L, Rambaldi A, Pasqualucci L, Rabadan R, Haferlach T, Falini B. Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*. 2011;118(23):6153-63.
 51. Gué M, Sun J-S, Boudier T. Simultaneous localization of MLL, AF4 and ENL genes in interphase nuclei by 3D-FISH: MLL translocation revisited. *BMC Cancer*. 2006; 6:20.
 52. Gutterman JU, Mavligit G, Burgess MA, McCredie KB, Hunter C, Freireich EJ, Hersh EM. Immunodiagnosis of acute leukemia: detection of residual disease. *J Natl Cancer Inst*. 1974;53(2):389-92.
 53. Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, Call KM, Pelletier J, Sohn RL, Douglass EC, Housman DE. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell*. 1990;61(7):1257-69.
 54. Haferlach C, Bacher U, Grossmann V, Schindela S, Zenger M, Kohlmann A, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Three novel cytogenetically cryptic EVI1 rearrangements associated with increased EVI1 expression and poor prognosis identified in 27 acute myeloid leukemia cases. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012a;51(12):1079-85.
 55. Haferlach C, Kern W, Schindela S, Kohlmann A, Alpermann T, Schnittger S, Haferlach T. Gene expression of BAALC, CDKN1B, ERG, and MN1 adds independent prognostic information to cytogenetics and molecular mutations in adult acute myeloid leukemia. *Genes, chromosomes Cancer*. 2012b;51(3):257-65.
 56. Haferlach T, Schoch C, Löffler H, Gassmann W, Kern W, Schnittger S, Fonatsch C, Ludwig WD, Wuchter C, Schlegelberger B, Staib P, Reichle A, Kubica U, Eimermacher H, Balleisen L, Grüneisen A, Haase D, Aul C,

- Karow J, Lengfelder E, Wörmann B, Heinecke A, Sauerland MC, Büchner T, Hiddemann W. Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J Clin Oncol*. 2003;21(2):256-265.
57. Heuser M, Berg T, Kuchenbauer F, Lai CK, Park G, Fung S, Lin G, Leung M, Krauter J, Ganser A, Humphries RK. Functional role of BAALC in leukemogenesis. *Leukemia*. 2012;26(3):532-6.
 58. Hokland P, Ommen HB. Towards individualized follow-up in adult acute myeloid leukemia in remission. *Blood*. 2011;117(9):2577-84.
 59. Hourigan CS, Karp JE. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):460-71.
 60. Chowdhury T, Brady HJ. Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40(2):192-199.
 61. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:523-31.
 62. Jones CH, Pepper C, Baird DM. Telomere dysfunction and its role in haematological cancer. *Br J Haematol*. 2012;156(5):573-87.
 63. Jorgensen JL, Chen SS. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methods and best applications. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011; 11 Suppl 1:S49-53.
 64. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, Blanchet O, Cayuela JM, Recher C, Raffoux E, Delaunay J, Pigneux A, Bulabois CE, Berthon C, Pautas C, Vey N, Lioure B, Thomas X, Luquet I, Terré C, Guardiola P, Béné MC, Preudhomme C, Ifrah N, Dombret H; French AML Intergroup. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(12):2213-23.
 65. Kato T, Hangaishi A, Ichikawa M, Motokura T, Takahashi T, Kurokawa M. A new three-way variant t(15;22;17)(q22;q11.2;q21) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol*. 2009;89(2):204-8.
 66. Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(3):379-390.
 67. Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2008;112(1):4-16.

68. Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;56(2):283-309.
69. Klaus M, Schnittger S, Haferlach T, Dreyling M, Hiddemann W, Schoch C. Cytogenetics, fluorescence in situ hybridization, and reverse transcriptase polymerase chain reaction are necessary to clarify the various mechanisms leading to an MLL-AF10 fusion in acute myelocytic leukemia with 10;11 rearrangement. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;144(1):36-43.
70. Kollmann K, Heller G, Schneckenleithner C, Warsch W, Scheicher R, Ott RG, Schäfer M, Fajmann S, Schleder M, Schiefer AI, Reichart U, Mayerhofer M, Hoeller C, Zöchbauer-Müller S, Kerjaschki D, Bock C, Kenner L, Hoefler G, Freissmuth M, Green AR, Moriggl R, Busslinger M, Malumbres M, Sexl V. A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2013;24(2):167-81.
71. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(4):619-28.
72. Kowarz E, Burmeister T, Lo Nigro L, Jansen MW, Delabesse E, Klingebiel T, Dingermann T, Meyer C, Marschalek R. Complex MLL rearrangements in t(4;11) leukemia patients with absent AF4.MLL fusion allele. *Leukemia*. 2007;21(6):1232-8.
73. Krivtsov, AV, Armstrong, SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nature Rev. Cancer*. 2007;7(11):823-833.
74. Langabeer SE, Rogers JR, Harrison G, Wheatley K, Walker H, Bain BJ, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC, Grimwade D; MRC Adult Leukaemia Working Party. EVI1 expression in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;112(1):208-11.
75. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, Boone E, Carter GI, Catherwood M, Davi F, Delfau-Larue MH, Diss T, Evans PA, Gameiro P, Garcia Sanz R, Gonzalez D, Grand D, Håkansson A, Hummel M, Liu H, Lombardia L, Macintyre EA, Milner BJ, Montes-Moreno S, Schuurin E, Spaargaren M, Hodges E, van Dongen JJ. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012;26(10):2159-71.
76. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift

- GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2424-33.
77. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, Dooling D, Dunford-Shore BH, McGrath S, Hickenbotham M, Cook L, Abbott R, Larson DE, Koboldt DC, Pohl C, Smith S, Hawkins A, Abbott S, Locke D, Hillier LW, Miner T, Fulton L, Magrini V, Wylie T, Glasscock J, Conyers J, Sander N, Shi X, Osborne JR, Minx P, Gordon D, Chinwalla A, Zhao Y, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson M, Baty J, Ivanovich J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Walter MJ, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008;456(7218):66-72.
 78. Lugthart S, Gröschel S, Beverloo HB, Kayser S, Valk PJ, van Zelderen-Bhola SL, Jan Ossenkoppele G, Vellenga E, van den Berg-de Ruitter E, Schanz U, Verhoef G, Vandenberghe P, Ferrant A, Köhne CH, Pfreundschuh M, Horst HA, Koller E, von Lilienfeld-Toal M, Bentz M, Ganser A, Schlegelberger B, Jotterand M, Krauter J, Pabst T, Theobald M, Schlenk RF, Delwel R, Döhner K, Löwenberg B, Döhner H. Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3890-8.
 79. Lutterbach B, Hiebert SW. Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene*. 2000;245(2):223-35.
 80. Macedo A, san Miguel JF, Vidriales MB, *et al*. Phenotypic changes in acute myeloid leukaemia: implication in the detection of minimal residual disease. *J Clin Pathol*. 1996;49(1):15-18.
 81. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):475-86.
 82. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Whitman SP, Becker H, Schwind S, Metzeler KH, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2348-55.
 83. Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, Archer KJ, Pettenati MJ, Heerema NA, Carroll AJ, Koduru PR, Kolitz JE, Sterling LJ, Edwards CG, Anastasi J, Larson RA, Bloomfield CD. Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free

survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B study 8461. *J Clin Oncol*. 2004;22(12):2410-2418.

84. Marks DI, Moorman AV, Chilton L, Paietta E, Enshaie A, DeWald G, Harrison CJ, Fielding AK, Foroni L, Goldstone AH, Litzow MR, Luger SM, McMillan AK, Racevskis J, Rowe JM, Tallman MS, Wiernik P, Lazarus HM. The clinical characteristics, therapy and outcome of 85 adults with acute lymphoblastic leukemia and t(4;11)(q21;q23)/MLL-AFF1 prospectively treated in the UKALLXII/ECOG2993 trial. *Haematologica*. 2013;98(6):945-52.
85. Marchesi F, Annibali O, Cerchiara E, Tirindelli MC, Avvisati G. Cytogenetic abnormalities in adult non-promyelocytic acute myeloid leukemia: a concise review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;80(3):331-46.
86. Marschalek R. Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *Br J Haematol*. 2011;152(2):141-54.
87. Martens JHA, Stunnenberg HG: The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Lett* 2010; 584(12):2662-2669.
88. Matsuda K, Hidaka E, Ishida F, Yamauchi K, Makishima H, Ito T, Suzuki T, Imagawa E, Sano K, Katsuyama T, Ota H. A case of acute myelogenous leukemia with MLL-AF10 fusion caused by insertion of 5' MLL into 10p12, with concurrent 3' MLL deletion. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;171(1):24-30.
89. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4263-9.
90. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, Pombo de Oliveira M, Renneville A, Villarese P, Macintyre E, Cavé H, Clappier E, Mass-Malo K, Zuna J, Trka J, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Oh SH, Tsaur G, Fechina L, van der Velden VH, van Dongen JJ, Delabesse E, Binato R, Silva ML, Kustanovich A, Aleinikova O, Harris MH, Lund-Aho T, Juvonen V, Heidenreich O, Vormoor J, Choi WW, Jarosova M, Kolenova A, Bueno C, Menendez P, Wehner S, Eckert C, Talmant P, Tondeur S, Lippert E, Launay E, Henry C, Ballerini P, Lapillone H, Callanan MB, Cayuela JM, Herbaux C, Cazzaniga G, Kakadiya PM, Bohlander S, Ahlmann M, Choi JR, Gameiro P, Lee DS, Krauter J, Cornillet-Lefebvre P, Te Kronnie G, Schäfer BW, Kubetzko S, Alonso CN, zur Stadt U, Sutton R, Venn NC, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Madsen HO, Archer P, Hancock J, Cerveira N, Teixeira MR, Lo Nigro L, Möricke A, Stanulla M, Schrappe M, Sedék L, Szczepański T, Zwaan CM, Coenen EA, van den Heuvel-Eibrink MM, Strehl S, Dworzak M, Panzer-Grümayer R, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. 2013;27(11):2165-76.

91. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Delabesse E, de Oliveira MP, Cavé H, Clappier E, van Dongen JJ, Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Beverloo HB, Panzer-Grümayer R, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Kjeldsen E, Schnittger S, Koehl U, Gruhn B, Heidenreich O, Chan LC, Yip SF, Krzywinski M, Eckert C, Möricke A, Schrappe M, Alonso CN, Schäfer BW, Krauter J, Lee DA, Zur Stadt U, Te Kronnie G, Sutton R, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Lo Nigro L, Tsaur G, Fechina L, Szczepanski T, Strehl S, Ilencikova D, Molkentin M, Burmeister T, Dinger mann T, Klingebiel T, Marschalek R. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*. 2009;23(8):1490-9.
92. Meyer C, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S, Schoch C, Jansen MW, van Dongen JJ, Pieters R, Haas OA, Dinger mann T, Klingebiel T, Marschalek R. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(2):449-54.
93. Miglino M, Colombo N, Pica G, Grasso R, Clavio M, Bergamaschi M, Ballerini F, Ghiso A, Ghiggi C, Mitscheunig L, Beltrami G, Cagnetta A, Vignolo L, Lucchetti MV, Aquino S, Pierri I, Sessarego M, Carella AM, Gobbi M. WT1 overexpression at diagnosis may predict favorable outcome in patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(10):1961-9.
94. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2014). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
95. Miyazaki T, Fujita H, Fujimaki K, Hosoyama T, Watanabe R, Tachibana T, Fujita A, Matsumoto K, Tanaka M, Koharazawa H, Taguchi J, Tomita N, Sakai R, Fujisawa S, Kanamori H, Ishigatsubo Y. Clinical significance of minimal residual disease detected by multidimensional flow cytometry: serial monitoring after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Leuk Res*. 2012;36(8):998-1003.
96. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, Vance GH, Cherry AM, Higgins RR, Fielding AK, Foroni L, Paietta E, Tallman MS, Litzow MR, Wiernik PH, Rowe JM, Goldstone AH, Dewald GW; Adult Leukaemia Working Party, Medical Research Council/National Cancer Research Institute. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109(8):3189-97.
97. Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev*. 2012;26(3):123-35.

98. Mrózek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol.* 2008;35(4):365-77.
99. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; 18(2):115-36.
100. Mrózek K, Heinonen K, Bloomfield CD. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001;14(1):19-47.
101. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood.* 2007;109(2):431-48.
102. Mrózek K, Radmacher MD, Bloomfield CD, Marcucci G. Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(2):64-9.
103. Mundle SD, Koska RJ. Fluorescence In Situ Hybridization: A major milestone in luminous cytogenetics. In: Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian.* 2nd Edition, New Jersey, Humana Press, 2006; 189-201.
104. Oelschlägel U, Nowak R, Schaub A, Köppel C, Herbst R, Mohr B, Löffler C, Range U, Günther H, Assmann M, Siegert E, Wendt E, Huhn R, Bräutigam E, Ehninger G. Shift of aberrant antigen expression at relapse or at treatment failure in acute leukemia. *Cytometry.* 2000;42(4):247-53.
105. Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:35-42.
106. Park TS, Song J, Lee KA, Kim J, Choi JH, Choi JR, Kim SJ, Min YH. Three-way Philadelphia variant t(9;22;14)(q34;q11.2;p11) in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009;191(1):55-6.
107. Plachy R, Zejskova L, Cmejla R, *et al.* Five-color multiplex Real-Time PCR technology to detect over 75 recurrent chromosomal abnormalities in acute myeloid leukemia; benefits for minimal residual disease detection. *Blood* 2011;2526
108. Qian Z, Joslin JM, Tennant TR, Reshmi SC, Young DJ, Stoddart A, Larson RA, Le Beau MM. Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia. *Chem Biol Interact.* 2010;184(1-2):50-7.
109. Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, Chen W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol.* 2012;43(10):1541-51.

110. Rao AV, Smith BD. Are results of targeted gene sequencing ready to be used for clinical decision making for patients with acute myelogenous leukemia? *Curr Hematol Malig Rep.* 2013;8(2):149-55.
111. Rohr SS, Pelloso LA, Borgo A, De Nadai LC, Yamamoto M, Rego EM, de Lourdes L F Chauffaille M. Acute promyelocytic leukemia associated with the PLZF-RARA fusion gene: two additional cases with clinical and laboratorial peculiar presentations. *Med Oncol.* 2012;29(4):2345-7.
112. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(2):105-17.
113. Sabattini E, Bacci F, Sagrmoso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica.* 2010;102(3):83-7.
114. Shaffer LG, McGowan-Jordan J., Schmid M. (eds) (2013): *ISCN: an international system for human cytogenetic nomenclature.* Basel: S. Karger.
115. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 2000;60(14): 3689-95.
116. Shim SH, Kyhm JH, Chung SR, Kim SR, Park MI, Lee CH, Cho YH. Generation of FISH probes using laser microbeam microdissection and application to clinical molecular cytogenetics. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17(7):1079-82.
117. Schmidt-Hieber M, Blau IW, Richter G, Türkmen S, Bommer C, Thiel G, Neitzel H, Stroux A, Uharek L, Thiel E, Blau O. Cytogenetic studies in acute leukemia patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;198(2):135-43.
118. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, Haferlach C, Haferlach T. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood.* 2009;114(11):2220-31.
119. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood.* 2005;106(12):3733-9.
120. Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood.* 2003;102(8):2746-55.

121. Schrappe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*.2012;2012:137-42.
122. Schwind S, Edwards CG, Nicolet D, Mrózek K, Maharry K, Wu YZ, Paschka P, Eisfeld AK, Hoellerbauer P, Becker H, Metzeler KH, Curfman J, Kohlschmidt J, Prior TW, Kolitz JE, Blum W, Pettenati MJ, Dal Cin P, Carroll AJ, Caligiuri MA, Larson RA, Volinia S, Marcucci G, Bloomfield CD; Alliance for Clinical Trials in Oncology. inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia with non-type A CBFB-MYH11 fusions associate with distinct clinical and genetic features and lack KIT mutations. *Blood*. 2013;121(2):385-91.
123. Sinclair P, Harrison CJ, Jarosová M, Foroni L. Analysis of balanced rearrangements of chromosome 6 in acute leukemia: clustered breakpoints in q22-q23 and possible involvement of c-MYB in a new recurrent translocation, t(6;7)(q23;q32 through 36). *Haematologica*. 2005;90(5):602-11.
124. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul;2(7):502-13.
125. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107(9):3724-6.
126. Strehl S, König M, Meyer C, Schneider B, Harbott J, Jäger U, von Bergh AR, Loncarevic IF, Jarosova M, Schmidt HH, Moore SD, Marschalek R, Haas OA. Molecular dissection of t(11;17) in acute myeloid leukemia reveals a variety of gene fusions with heterogeneous fusion transcripts and multiple splice variants. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45(11):1041-9.
127. Suzukawa K, Parganas E, Gajjar A, Abe T, Takahashi S, Tani K, Asano S, Asou H, Kamada N, Yokota J, *et al*. Identification of a breakpoint cluster region 3' of the ribophorin I gene at 3q21 associated with the transcriptional activation of the EVI1 gene in acute myelogenous leukemias with inv(3)(q21q26). *Blood*. 1994;84(8):2681-8.
128. Szczepański T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia*. 2007;21(4):622-6.
129. Szczepański T, Orfão A, van der Velden VH, San Miguel JF, van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol*. 2001;2(7):409-17.
130. van der Velden VH, van Dongen JJ. MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2009;538:115-50.

131. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-317.
132. van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta*. 1991;198(1-2):1-91.
133. van Limbergen H, Poppe B, Janssens A, De Bock R, De Paepe A, Noens L, Speleman F. Molecular cytogenetic analysis of 10;11 rearrangements in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002;16(3):344-51.
134. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114(5):937-51.
135. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJ. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005;106(12):3747-54.
136. Wang D, Zhu G, Wang N, Zhou X, Yang Y, Zhou S, Xiong J, He J, Jiang L, Li C, Xu D, Huang L, Zhou J. SIL-TAL1 rearrangement is related with poor outcome: a study from a Chinese institution. *PLoS One*. 2013;8(9):e73865.
137. Weber S, Alpermann T, Dicker F, Jeromin S, Nadarajah N, Eder C, Fasan A, Kohlmann A, Meggendorfer M, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4:e173.
138. Weissner M, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Feasibility of using the combined MDS-EVI1/EVI1 gene expression as an alternative molecular marker in acute myeloid leukemia: a report of four cases. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;177(1):64-9.
139. Weissner M, Kern W, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukemia during therapy. *Haematologica*. 2005;90(7):881-9.

140. Yanada M, Terakura S, Yokozawa T, Yamamoto K, Kiyoi H, Emi N, Kitamura K, Kohno A, Tanaka M, Tobita T, Takeo T, Sao H, Kataoka T, Kobayashi M, Takeshita A, Morishita Y, Naoe T, Sugiura I. Multiplex real-time RT-PCR for prospective evaluation of WT1 and fusion gene transcripts in newly diagnosed de novo acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(9):1803-8.
141. Yin JA, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood*. 2012;120(14):2826-35.

8 Přílohy

Příloha I Prezentace výsledků

Příloha II

Příloha III

Příloha IV

Publikace *in extenso* se vztahem k tématu dizertační práce

Příloha I

• Publikace, které jsou podkladem dizertace

Jancuskova T., Plachy R., Zemankova L., Hardekopf D. W., Stika J., Zejskova L., Praulich I., Kreuzer K.-A., Rothe A., Othman M.A., Kosyakova N., Pekova S. Molecular characterization of the rare translocation t(3;10)(q26;q21) in an acute myeloid leukemia patient. Mol Cytog. 2014;7:47
IF 2,662

Jancuskova T., Plachy R., Stika J., Zemankova L., Hardekopf D. W., Liehr T., Kosyakova N., Cmejla R., Zejskova L., Kozak T., Zak P., Zavrelova A., Havlikova P., Karas M., Junge A., Ramel C., Pekova S. A method to identify new molecular markers for assessing minimal residual disease in acute leukemia patients. Leuk Res. 2013;37(10):1363-73.
IF 2,692

Jančušková T., Plachý R., Štika J., Krutílková L., Hardekopf D. W., Liehr T., Kosyakova N., Čmejla R., Žejšková L., Kozák T., Žák P., Karas M., Peková S. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií. Transfuze Hematol. dnes, 19, 2013, No. 1, p. 8-21.

• Prezentace na zahraničních konferencích

Jancuskova T., Plachy R., Stika J., Zemankova L., Liehr T., Kosyakova N., Zejskova L., Zak P., Zavrelova A., Havlikova P., Pekova S. A Novel Approach for Unique MRD Markers Identification in Acute Leukemia Patients. 2nd International Conference on Predictive, Preventive and Personalized Medicine & Molecular Diagnostics, Las Vegas, USA 11/2014 – přednáška

Abstrakt: J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics 2014;5(5):46
IF 1,05

Jancuskova T., Plachy R., Stika J., Hardekopf D. W., Zejskova L., Praulich I., Kreuzer K. A., Kosyakova N., Liehr T., S Pekova S. Characterization of the Rare Translocation t(3;10)(q26;q21) in an Acute Myeloid Leukemia Patient. 19th Congress of European Hematology Association, Milan, Italy, 06/2014 – poster

Abstrakt: Haematologica 2014;99(s1):283-284. abstract n. P781
IF 5,868

Pekova S., **Jancuskova T.**, Plachy R., Stika J., Zemankova L., Hardekopf D. W., Liehr T., Kosyakova N., Cmejla R., Zejskova L., Kozak T., Zak P., Zavrelova A., Havlikova P., Karas M., Junge A., Ramel C. Identification of new molecular markers for minimal residual disease assessment in acute leukemia patients. 3rd World Congress on Cancer Science & Therapy, San Francisco, USA, 10/2013 – přednáška

Abstrakt: J Cancer Sci Ther 2013;5(10): 55.
IF 4,203

Pekova S., **Jancuskova T.**, Plachy R., Stika J., Zemankova L., Hardekopf D. W., Liehr T., Kosyakova N., Zejskova L. Identification of novel molecular markers for minimal

residual disease assessment in acute leukemia. International Conference on Hematology & Blood Disorder, Raleigh, USA, 09/2013 – přednáška

Abstrakt: J Blood Disord Transfus 2013;4(5):76

IF 1,378

Jancuskova T., Plachy R., Stika J., Zemankova L., D Hardekopf D., Liehr T., Kosyakova N., Zejskova L., Sedlackova L., Cmejla R., Pekova S. Mapping of Unique Chromosomal Abnormalities as a Tool for Sensitive Minimal Residual Disease Assessment in Acute Leukemia Patients. 18th Congress of European Hematology Association, Stockholm, Sweden, 06/2013 – poster

Abstrakt: Haematologica 2013; 98(s1):394-395. abstract n. P953

IF 5,868

Jancuskova T., Pekova S, Plachy R., Hardekopf D., Liehr T., Weise A., Kosyakova N., Stika J., L Zejskova L., Sedlackova L., Krutilkova L, Cmejla R. From Cytogenetics to Molecular Biology: Mapping of Unique Chromosomal Abnormalities at the Nucleotide Level. 17th Congress of European Hematology Association, Amsterdam, Netherlands, 06/2012 – poster

Abstrakt: Haematologica 2012;97(s1):279. abstract n. 0684

IF 5,935

Hardekopf D.W., **Jancuskova T.**, Jarosova M., Krutilkova L., Plachy R., Zejskova L., Cmejla R., Vydra J., Kozak T., Karas M., Koza V., Zavrelova A., Zak P., Smolej L., Pekova S. Identification of Novel Molecular Markers for the Follow-up of Minimal Residual Disease in Hematooncological Disorders - 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, USA, 12/2011

Abstrakt: Blood 2011;118:4905.

IF 9,898

Plachy R., Zejskova L., Cmejla R., Hardekopf W.D., **Jancuskova T.**, Krutilkova L., Karas M, Koza V., Vydra J., Zak P., Smolej L. and Pekova S. Five-color multiplex Real-Time PCR technology to detect over 64 recurrent chromosomal abnormalities in acute myeloid leukemia; benefits for minimal residual disease detection. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, USA, 12/2011 – poster

Abstrakt: Blood 2011;118:2526.

IF 9,898

• Prezentace na tuzemských konferencích

Jančušková T., Plachý R., Zemánková L., Štika J., Žejšková L., Mazal O., Kosyakova N., Liehr T., Praulich I., Kreuzer K.-A., Peková S. Mapování chromozomových zlomů jako nástroj k identifikaci unikátních molekulárních markerů pro sledování MRN u pacientů s AML. 47. výroční zasedání Cytogenetické sekce Čs. biologické společnosti, Praha, 09/2014 – přednáška

Jančušková T., Plachý R., Štika J., Hardekopf D. W., Žejšková L., Praulich I., Kreuzer K. A., Kosyakova N., Liehr T., Peková S. Mapování chromozomového zlomu zahrnutého do unikátní translokace t(3;10)(q26;q21) u pacienta s akutní myeloidní leukémií. XXVIII. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 06/2014 – přednáška

Abstrakt: Sborník abstrakt 2014:41-42; č. 2624; ISBN 978-80-244-4099-6

Žejšková L., Plachý R., **Jančušková T.**, Hardekopf D. W., Jiří Štika J., Kosyakova N., Liehr T., Zavřelová A., Žák P., Petečuková V., Novák J., Kozák T., Peková S. Možnosti detekce zlomových míst u přestaveb zahrnujících gen MLL. XXVIII. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 06/2014 – poster

Abstrakt: Sborník abstrakt 2014:77-78; č. P49/2625; ISBN 978-80-244-4099-6

Jančušková T., Plachý R., Štika J., Zemánková L., Hardekopf D., Žejšková L., Sedláčková L., Peková S. Sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií pomocí nově identifikovaných molekulárních markerů. 46. výroční konference Cytogenetické sekce Čs. biologické společnosti, Brno, 09/2013 – přednáška

Jančušková T. Sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií pomocí nově identifikovaných molekulárních markerů. Studentská vědecká konference 3. lékařské fakulty, Praha, 05/2013 – přednáška

Abstrakt: Sborník abstrakt 2013:31-33; ISBN 978-80-260-4327-0

Hardekopf D. W., **Jancuskova T.**, Plachy R., Krutilkova L., Liehr T., Kosyakova N., Štika J., Zejskova L., Pekova S. Identification of novel molecular markers for MRD follow-up in acute leukemia. Proceedings in Molecular Medicine, Praha 03/2013 – přednáška

Jančušková T., Plachý R., Hardekopf D. W., Lucie Krutílková L., Štika J., Žejšková L., Sedláčková L., Peková S. Od cytogenetiky k molekulární biologii: mapování unikátních chromozomových zlomů na úroveň nukleotidů. 45. výroční cytogenetická konference, Olomouc, 09/2012 – přednáška

Jančušková T., Plachý R., Hardekopf D. W., Lucie Krutílková L., Štika J., Žejšková L., Sedláčková L., Peková S. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií. XXIII. Izakovičov memoriál, Bratislava, 09/2012 – přednáška

Abstrakt: Sborník abstrakt 2012:18-19

Jancuskova T., Plachy R., Hardekopf D. W., Liehr T., Weise A., Kosyakova N., Štika J., Zejskova L., Sedlackova L., Krutilkova L., Cmejla R., Pekova S. From Cytogenetics to Molecular Biology: Mapping of Unique Chromosomal Abnormalities at the Nucleotide Level. XXVI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 06/2012 – přednáška

Abstrakt: Sborník abstrakt 2012; ISBN 978-80-244-3157-4

Jančušková T., Plachý R., Hardekopf D. W., Liehr T., Weise A., Kosyakova N., Štika J., Žejšková L., Sedláčková L., Krutílková L., Čmejla R., Peková S. Od cytogenetiky k molekulární biologii: mapování unikátních chromozomových zlomů na úroveň nukleotidů. Konference DNA analýza IX, Praha, 06/2012 – přednáška

Jančušková T., Plachý R., Štika J., Hardekopf D. W., Krutílková L., Liehr T., Žejšková L., Čmejla R., Žák P., Kozák T., Koza V., Peková S. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutní myeloidní leukémie. IX. Hradecký cytogenetický den, Hradec Králové, 05/2012 – přednáška

Jančušková T. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutní myeloidní leukémie. Studentská vědecká konference 3. lékařské fakulty, Praha, 05/2012 – přednáška

Abstrakt: Sborník abstrakt 2012:125-126; ISBN 978-80-260-2180-3

- uděleno 3. místo v postgraduální sekci

Jančušková T., Hardekopf D. W., Krutílková L., Čmejla R., Plachý R., Žejšková L., Vydra J., Karas M., Koza V., Zavřelová A., Peková S. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 44. Výroční cytogenetická konference, Třeboň, 09/2011 – přednáška

Abstrakt: Sborník (nečíslováno); ISBN 978-80-260-0415-8

Jančušková T., Peková S., Hardekopf D. W., Čmejla R., Žejšková L., Plachý R. Od megabází k bázím, aneb kterak molekulárně uchopit genomové abnormality. Konference DNA analýza VIII, Praha, 06/2011 – přednáška

Hardekopf D. W., **Jančušková T.,** Jarošová M., Plachý R., Žejšková L., Čmejla R., Vydra J., Kozák T., Karas M., Koza V., Zavřelová A., Žák P., Peková S. Identification of novel molecular markers for the follow-up of minimal residual disease in hematological disorders. XXV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 06/2011 – přednáška

Abstrakt: Transfuzní Hematol. dnes. 2011;17(S2):53-54

• Publikace bez vztahu k tématu dizertace

Drabova J., Seemanova E., Hancarova M., Horacek M., **Jancuskova T.,** Pekova S., Novotna D., Sedlacek Z. Long term follow-up in a patient with a de novo microdeletion of 14q11.2 involving CHD8. Am J Med Genet A. – in press
IF 2,048

Pekova S., Vydra J., Kabickova H., Frankova S., Haugvicova R., Mazal O., Cmejla R., Hardekopf D. W., **Jancuskova T.,** Kozak T. Candidatus Neoehrlichia mikurensis infection identified in 2 hematologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;69(3):266-70.
IF 2,528

Pekova S., Mazal O., Cmejla R., Hardekopf D.W., Plachy R., Zejskova L., Haugvicova R., **Jancuskova T.,** Karas M., Koza V., Smolej L., Bezdickova L., Kozak T. A comprehensive study of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of 1287 diagnostic and 1148 follow-up CLL samples. Leuk Res. 2011;35(7):889-98.
IF 2,923

Zejskova L., **Jancuskova T.,** Kotlabova K., Doucha J., Hromadnikova I. Feasibility of fetal-derived hypermethylated RASSF1A sequence quantification in maternal plasma-- next step toward reliable non-invasive prenatal diagnostics. Exp Mol Pathol. 2010;89(3):241-7.
IF 2,986

Hromadnikova I., Zejskova L., Kotlabova K., **Jancuskova T.**, Doucha J, Dlouha K, Krofta L, Jirasek JE, Vlk R. Quantification of extracellular DNA using hypermethylated RASSF1A, SRY, and GLO sequences--evaluation of diagnostic possibilities for predicting placental insufficiency. DNA Cell Biol. 2010;29(6):295-301.
IF 2,159

Příloha II

Jancuskova T., Plachy R., Zemankova L., Hardekopf D. W., Stika J., Zejskova L., Praulich I, Kreuzer K.-A., Rothe A., Othman M.A., Kosyakova N., Pekova S. Molecular characterization of the rare translocation t(3;10)(q26;q21) in an acute myeloid leukemia patient. Mol Cytog. 2014;7:47
IF 2,662

Příloha III

Jancuskova T, Plachy R., Stika J., Zemankova L., Hardekopf D. W., Liehr T., Kosyakova N, Cmejla R., Zejskova L., Kozak T., Zak P., Zavrelova A., Havlikova P., Karas M., Junge A., Ramel C., Pekova S. A method to identify new molecular markers for assessing minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leuk Res.* 2013;37(10):1363-73.

IF 2,692

Příloha IV

Jančušková T., Plachý R., Štika J., Krutílková L., Hardekopf D. W., Liehr T., Kosyakova N., Čmejla R., Žejšková L., Kozák T., Žák P., Karas M., Peková S. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií. Transfuze Hematol. dnes, 19, 2013, No. 1, p. 8-21.

CASE REPORT

Open Access

Molecular characterization of the rare translocation t(3;10)(q26;q21) in an acute myeloid leukemia patient

Tereza Jancuskova^{1*}, Radek Plachy¹, Lucie Zemankova¹, David Warren Hardekopf¹, Jiri Stika¹, Lenka Zejskova¹, Inka Praulich², Karl-Anton Kreuzer², Achim Rothe³, Moneeb AK Othman⁴, Nadezda Kosyakova⁴ and Sona Pekova¹

Abstract

Background: In acute myeloid leukemia (AML), the MDS1 and EVI1 complex locus - *MECOM*, also known as the ecotropic virus integration site 1 - *EVII*, located in band 3q26, can be rearranged with a variety of partner chromosomes and partner genes. Here we report on a 57-year-old female with AML who presented with the rare translocation t(3;10)(q26;q21) involving the *MECOM* gene. Our aim was to identify the fusion partner on chromosome 10q21 and to characterize the precise nucleotide sequence of the chromosomal breakpoint.

Methods: Cytogenetic and molecular-cytogenetic techniques, chromosome microdissection, next generation sequencing, long-range PCR and direct Sanger sequencing were used to map the chromosomal translocation.

Results: Using a combination of cytogenetic and molecular approaches, we mapped the t(3;10)(q26;q21) to the single nucleotide level, revealing a fusion of the *MECOM* gene (3q26.2) and *C10orf107* (10q21.2).

Conclusions: The approach described here opens up new possibilities in characterizing acquired as well as congenital chromosomal aberrations. In addition, DNA sequences of chromosomal breakpoints may be a useful tool for unique molecular minimal residual disease target identification in acute leukemia patients.

Keywords: AML, *MECOM*, Chromosomal microdissection, Next-generation sequencing, Molecular marker

Background

EVI1 is one of several protein isoforms encoded by the *MECOM* locus at human chromosome 3q26 that also yields the MDS1 and MDS1-EVI1 protein isoform [1]. The role of MDS1 and MDS1-EVI1 in malignancy is still unclear, though the EVI1 transcription factor plays an essential role in the proliferation and maintenance of hematopoietic stem cells [2]. Aberrant EVI1 expression occurs in approximately 8% of patients with *de novo* acute myeloid leukemia (AML) [3]. The overexpression of *EVII* can be achieved not only through rearrangements of band 3q26 but also without the presence of 3q26 abnormalities, therefore indicating that other mechanisms can lead to *EVII* activation [4-6]. Moreover, a substantial number of patients with 3q26 rearrangements do not

express *EVII* [7]. In approximately 2% of AML cases, inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) is observed, where it has been suggested that the promoter of the house-keeping *RPN1* gene could be responsible for the activation of *EVII* [8]. Other *EVII* rearrangements include, e.g. 7q21 (*CDK6*), 7q34 (*TCRB*), 12p13 (*ETV6*) and 21q22 (*RUNX1*) [6,9]. Even though partner chromosomes and molecular consequences differ between various types of *EVII* rearrangements, elevated expression predicts poor prognosis for the affected patients [4,10,11].

Here we report the rare case of chromosomal translocation t(3;10)(q26;q21) involving *MECOM*. Using modern cytogenetic and molecular biological techniques we were able to characterize the nucleotide sequence of this breakpoint and thus identify the fusion partner on chromosome 10.

* Correspondence: tereza.jancuskova@synlab.cz

¹Laboratory for Molecular Diagnostics, synlab genetics s.r.o., Evropska 176/16, Prague 6 16000, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article

Case presentation

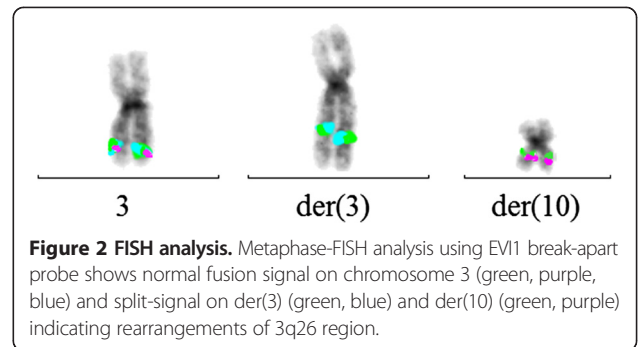
A 57-year old female was diagnosed with AML (FAB M2) after a blood cell count and bone marrow examination was initiated in June 2013. Hematologic parameters were as follows: hemoglobin 6,2 g/dl, platelets $44 \times 10^9/l$, and white blood cells (WBC) $3,34 \times 10^9/l$ with 7,8% neutrophils, 62,9% lymphocytes and 28,7% monocytes, 0% eosinophils and 0,3% basophils. A bone marrow aspirate revealed slightly hypercellular marrow with normo-cellular particles. Megakaryocytes were found in reduced density. There was significant hiatus leucaemicus with evidence of medium-sized blasts with poor basophilic cytoplasm and distinct granulation. Flow cytometry performed on the bone marrow revealed 31% myeloid-appearing blasts with expression of CD34 and CD117, and confirmed the diagnosis of AML.

Conventional cytogenetic analysis of a 24-h culture, performed on bone marrow cells by standard techniques and evaluated by G-banding, revealed a balanced $t(3;10)(q26;q21)$ in 20/22 metaphases. Involvement of the *MECOM* gene was confirmed by FISH with the use of a commercially available probe set.

Results

Cytogenetic and molecular-cytogenetic analyses of bone marrow cultures revealed an aberrant karyotype $46,XX,t(3;10)(q26;q21)$ – Figure 1. A commercial *EVII* break-apart probe yielded a split signal in all dividing and 80% of the interphase bone marrow cells, demonstrating the rearrangement of the 3q26 chromosomal region (Figure 2).

Ten derivative chromosome 10 breakpoint regions were dissected, amplified and sequenced. In total, 81 753 reads were obtained and aligned to reference sequences of chromosomes 3 and 10 (NCBI build 37.3). Long-range



PCR primer design resulted in a product that was then subjected to Sanger sequencing. The nucleotide sequence of the *der(10)* breakpoint (Figure 3) revealed a fusion of the *MECOM* gene on 3q26 to *C10orf107* on 10q21.

Additionally, the bone marrow sample was subjected to reverse transcription real-time PCR analysis to determine the expression levels of *cEVII* (i.e., the sum of all *EVII* mRNA variants) relative to those of the internal reference gene *ABL*. We found that *EVII* expression was 26-fold higher when compared with healthy control (data not shown).

Discussion

In the present report we describe a rare case of acute myeloid leukemia with a $t(3;10)(q26;q21)$ translocation involving *MECOM*. To our knowledge [12], only one case with this translocation has been reported [9], but the fusion partner on chromosome 10 was not characterized. Using a novel technical approach we were able to identify the fusion partner and precise nucleotide sequence of the breakpoint, which may serve as a patient-specific molecular target for subsequent real-time PCR-based minimal

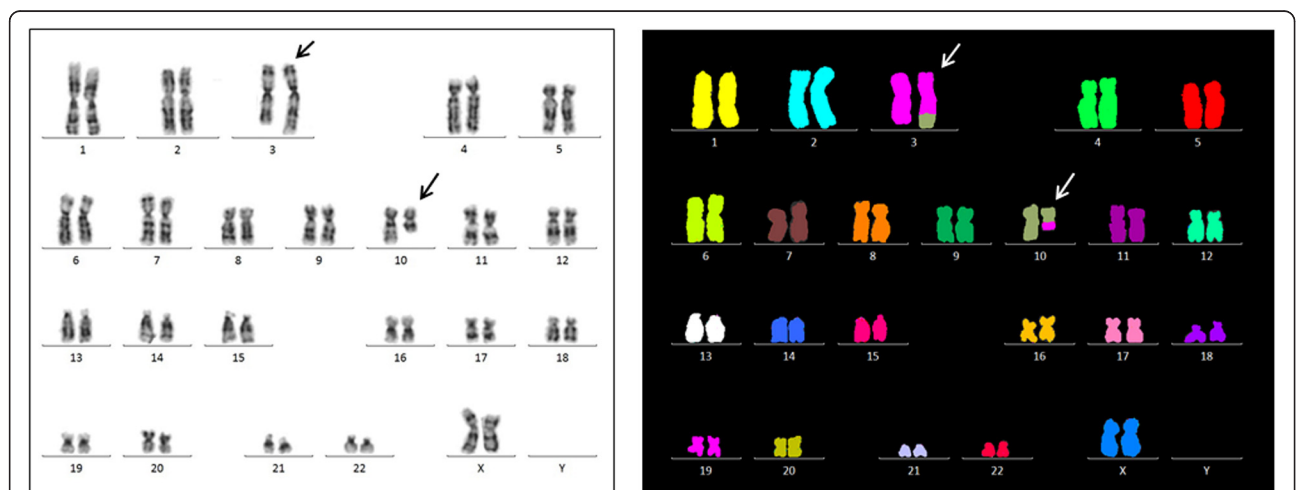
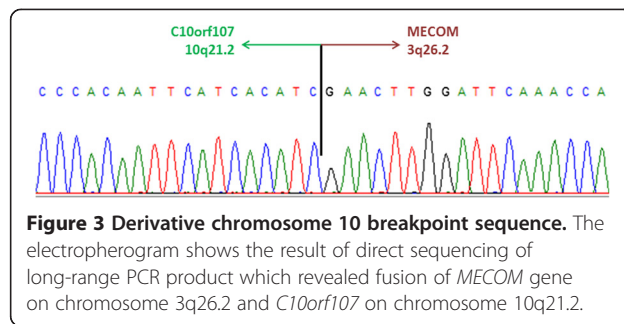


Figure 1 Karyotype analyses. G-banding (left part) and multicolor FISH (mFISH) (right part) analyses showed aberrant karyotype $46,XX,t(3;10)(q26;q21)$. The arrows indicate the derivative chromosomes.



residual disease (MRD) monitoring. We further demonstrated by real-time quantitative reverse transcription PCR that the t(3;10)(q26;q21) results in *EVII* over-expression.

Deregulated expression of *EVII* and other genes (e.g. *BAALC*, *WT1*) involved in cell proliferation, survival and differentiation have been used as alternative MRD targets [13-16]. However, the sensitivity of expression assays is dependent on the level of initial expression; therefore, these assays are suitable only in AML cases with a high initial expression level of a specific target normalized to an endogenous control gene at diagnosis. Even in those cases, the sensitivity is usually not sufficient for subsequent MRD monitoring. Therefore, in patients presenting with a fusion transcript and/or gene mutation, a specific PCR assay is preferred. These PCR-based methods are currently the most sensitive techniques for MRD follow-up, reaching sensitivities of 10^{-4} – 10^{-5} [17,18].

Real-time PCR-based MRD assays allow the highly accurate quantification of residual leukemic cells and evaluations of treatment outcome in AML patients. The merit of MRD monitoring during patient's treatment and prognostic relevance has been confirmed by various studies [17,19,20]. Common targets for MRD detection include fusion transcripts (e.g. *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* , *DEK-NUP214*, *CBF β -MYH11*) [21] and mutations of clinically relevant genes (e.g. *NPM1*, *CEBP α* , *FLT3*, *c-KIT*) [17-22]. Unfortunately, approximately half of AML patients lack a molecular target suitable for MRD monitoring [23]. Therefore, introducing novel approaches for the identification of unique clone-specific markers is highly desirable. The procedure described here is based on characterizing nucleotide sequences of unique chromosomal breakpoints, allowing the design of a specific real-time PCR assay for MRD assessment. In this way, AML patients could benefit from accurate and sensitive MRD monitoring, even in the absence of other well-introduced molecular marker [24].

Mapping chromosome breakpoints is a conventional method for identifying specific genes in leukemic patients, as well as patients with solid tumors and individuals with balanced translocations [25-27]. A fundamental requirement is the ability to karyotype and precisely identify

derivative chromosomes using classic karyotyping or molecular cytogenetic tools such as mFISH and mBAND analyses. Hybridization with even higher resolution, such as BAC-FISH (Bacterial Artificial Chromosome FISH) can help to narrow-down the chromosomal breakpoints further, though it is still not subtle enough to allow subsequent molecular methods to be used and to identify nucleotide sequence. There have been a number of methods proposed to address this issue, with varying strengths and weaknesses. Array-CGH has improved in resolution, allowing deletions, amplifications, and non-balanced translocations to be more precisely characterized, but array-CGH in principle cannot detect targets arising from balanced chromosomal translocations [28].

Conclusion

The combination of cytogenetic and molecular methods described here enabled us to proceed from the chromosomal level (cytogenetically identified abnormality) to the molecular level (unique DNA sequence) in a case of the novel t(3;10)(q26;q21) translocation. Using this procedure, acquired as well as congenital chromosomal aberrations can be characterized. In contrast to other mapping methods (e.g. BAC-FISH, array CGH) our technique allows the rapid mapping of chromosomal breakpoints down to the DNA sequence level and immediate elucidation of possible genes involved. This can be invaluable for studying such aberrations in a wide variety of fields, including the evolution of diseases or the genetic basis of inherited syndromes.

Methods

Cytogenetic and molecular cytogenetic analyses

The heparinized bone marrow sample was cultivated for 24 h in RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin/streptomycin and L-glutamine (PAA Laboratories, Austria) at 37°C/5% CO₂. Karyotype was investigated by G-banding and multiplex fluorescence *in situ* hybridization (mFISH) with the 24XCyte probe kit (MetaSystems, Germany). ISCN 2013 nomenclature was used to describe chromosome abnormalities [29]. Interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis was performed using a commercially available *EVII* break-apart probe (MetaSystems, Germany).

DNA/RNA isolation, reverse transcription

DNA and RNA were isolated from the mononuclear fraction of bone marrow samples at diagnosis. DNA was isolated using the MagNA Pure automatic isolator (Roche, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA was extracted by TRI Reagent (Molecular Research Center, USA) according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was performed using the

Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions.

Real-time quantitative reverse transcriptase PCR

Primers and probes to amplify and quantify *EVII*-expression were forward: 5' ACCCACTCCTTCTTTA TGGACC 3', reverse: 5' TGATCAGGCAGTTGGAATT GTG 3', probe: FAM - 5' TGAGGCCTTCTCCAGGAT TCTTGTTCAC 3' - BHQ1. Expression was normalized against the expression of the control gene ABL. Primers and probe to quantify ABL gene were as follows: forward: 5' TCCTCCAGCTGTTATCTGGAAGA 3', reverse: 5' T GGGTCCAGCGAGAAGGTT 3', probe: FAM-5' CCAG TAGCATCTGACTTTGAGCCTCAGGG 3' - BHQ1. PCR conditions started with a denaturation at 95°C for 8 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 20 s, annealing at 57°C for 30 s and elongation at 72°C for 30 s.

Chromosomal breakpoint identification

The cell suspension and DNA sample were treated and analyzed as previously described [24]. Briefly, regions around the breakpoints of derivative chromosomes were dissected by glass microneedles manipulated by micromanipulator using an inverted microscope (Axiovert 10, Zeiss, Germany). The microdissected fragments were directly subjected to amplification by degenerate oligo-nucleotide-primed (DOP) PCR and then sequenced on the GS Junior platform (Roche, Germany) for next generation sequencing. Obtained reads were aligned to reference sequences of chromosomes 3 and 10, using in-house developed software. The last mapped reads from both chromosomes were used as docking sites for primers for long-range PCR to amplify the putative breakpoint. Primers for long-range PCR were designed in Vector NTI Advance (v. 11.5, Invitrogen, USA). PCR amplification was done using the Expand Long Range dNTPack kit (Roche, Germany). The long-range PCR product was directly sequenced using Sanger sequencing to reveal the precise nucleotide sequence of the breakpoint.

Consent

Written informed consent was obtained from the patient for publication of this Case Report. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TJ, RP, LZ, DWH, LZ participated in the design of the study and carried out molecular cytogenetic and molecular genetic studies; RP designed the computer software and performed the biostatistical analysis; JS carried out the next-generation sequencing; IP, K-AK, AR performed flow cytometry analysis, collected and provided the clinical data; OAKM, NK performed

chromosomal microdissection; SP designed and coordinated the study. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The work was supported by Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (Grant FR-TI2/579) and by DAAD.

Author details

¹Laboratory for Molecular Diagnostics, synlab genetics s.r.o., Evropska 176/16, Prague 6 16000, Czech Republic. ²Department I of Internal Medicine, University at Cologne, Kerpener Str., Cologne, Germany. ³Oncological Therapy Center, Buchforststr., Cologne, Germany. ⁴Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Kollegiengasse 10, Jena, Germany.

Received: 27 May 2014 Accepted: 2 July 2014

Published: 15 July 2014

References

1. Fears S, Mathieu C, Zeleznik-Le N, Huang S, Rowley JD, Nucifora G: **Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(4):1642-1647.
2. Goyama S, Kurokawa M: **Pathogenetic significance of ecotropic viral integration site-1 in hematological malignancies.** *Cancer Sci* 2009, **100**(6):990-995.
3. Nucifora G, Laricchia-Robbio L, Senyuk V: **EVI1 and hematopoietic disorders: history and perspectives.** *Gene* 2006, **368**:1-11.
4. Gröschel S, Lugthart S, Schlenk RF, Valk PJ, Eiwien K, Goudswaard C, van Putten WJ, Kayser S, Verdonck LF, Lübbert M, Ossenkoppele GJ, Germing U, Schmidt-Wolf I, Schlegelberger B, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Löwenberg B, Döhner K, Delwel R: **High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(12):2101-2107.
5. Arai S, Yoshimi A, Shimabe M, Ichikawa M, Nakagawa M, Imai Y, Goyama S, Kurokawa M: **Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells.** *Blood* 2011, **117**(23):6304-6314.
6. Haeflrich C, Bacher U, Grossmann V, Schindela S, Zenger M, Kohlmann A, Kern W, Haeflrich T, Schnittger S: **Three novel cytogenetically cryptic EVI1 rearrangements associated with increased EVI1 expression and poor prognosis identified in 27 acute myeloid leukemia cases.** *Genes Chromosomes Canc* 2012, **51**(12):1079-1085.
7. Langabeer SE, Rogers JR, Harrison G, Wheatley K, Walker H, Bain BJ, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC, Grimwade D, MRC Adult Leukaemia Working Party: **EVI1 expression in acute myeloid leukaemia.** *Br J Haematol* 2001, **112**(1):208-211.
8. Suzukawa K, Parganas E, Gajjar A, Abe T, Takahashi S, Tani K, Asano S, Asou H, Kamada N, Yokota J, Morishita K, Ihle JN: **Identification of a breakpoint cluster region 3' of the ribophorin I gene at 3q21 associated with the transcriptional activation of the EVI1 gene in acute myelogenous leukemias with inv(3)(q21q26).** *Blood* 1994, **84**(8):2681-2688.
9. Lugthart S, Gröschel S, Beverloo HB, Kayser S, Valk PJ, van Zelderen-Bhola SL, Jan Ossenkoppele G, Vellenga E, van den Berg-de RE, Schanz U, Verhoef G, Vandenbergh P, Ferrant A, Köhne CH, Pfreundschuh M, Horst HA, Koller E, von Lilienfeld-Toal M, Bentz M, Ganser A, Schlegelberger B, Jotterand M, Krauter J, Pabst T, Theobald M, Schlenk RF, Delwel R, Döhner K, Löwenberg B, Döhner H: **Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(24):3890-3898.
10. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CA, Valk PJ, Beverloo HB, Löwenberg B, Delwel R: **High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated.** *Blood* 2008, **111**(8):4329-4337.
11. Kataoka K, Kurokawa M: **Ecotropic viral integration site 1, stem cell self-renewal and leukemogenesis.** *Cancer Sci* 2012, **103**(8):1371-1377.
12. Mitelman F, Johansson B, Mertens F (Eds): **Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer**; 2014. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.

13. Weber S, Alpermann T, Dicker F, Jeromin S, Nadarajah N, Eder C, Fasan A, Kohlmann A, Meggendorfer M, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S: **BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.** *Blood Cancer J* 2014, **4**:e173.
14. Weisser M, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S: **Feasibility of using the combined MDS-EV11/EV1 gene expression as an alternative molecular marker in acute myeloid leukemia: a report of four cases.** *Cancer Genet Cytogenet* 2007, **177**(1):64–69.
15. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, Gottardi E, Fava M, Schnittger S, Weiss T, Izzo B, Nomdedeu J, van der Heijden A, van der Reijden BA, Jansen JH, van der Velden VH, Ommen H, Preudhomme C, Saglio G, Grimwade D: **Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(31):5195–5201.
16. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, Slater R, Smit EM, Beverloo HB, Verhoef G, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Sonneveld P, de Greef GE, Löwenberg B, Delwel R: **High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients.** *Blood* 2003, **101**(3):837–845.
17. Shook D, Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Campana D: **Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia.** *Clin Lymphoma Myeloma* 2009, **9**(Suppl 3):S281–S285.
18. Rossi G, Minervini MM, Carella AM, de Waure C, di Nardo F, Melillo L, D'Arena G, Zini G, Cascavilla N: **Comparison between multiparameter flow cytometry and WT1-RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets.** *Leuk Res* 2012, **36**(4):401–406.
19. Abdelhamid E, Preudhomme C, Helevaut N, Nibourel O, Gardin C, Rousselot P, Castaigne S, Gruson B, Berthon C, Soua Z, Renneville A: **Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia.** *Leuk Res* 2012, **36**(3):316–323.
20. Perea G, Lasa A, Aventin A, Domingo A, Villamor N, de Llano MPQ, Llorente A, Junca J, Palacios C, Fernandez C, Gallart M, Font L, Tormo M, Florensa L, Bargay J, Martí JM, Vivancos P, Torres P, Berlanga JJ, Badell I, Brunet S, Sierra J, Nomdedeu JF, Grupo Cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Miel: **Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)].** *Leukemia* 2006, **20**(1):87–94.
21. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK, National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group: **Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials.** *Blood* 2010, **116**(3):354–365.
22. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group, Döhner H: **Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.** *N Engl J Med* 2008, **358**(18):1909–1918.
23. Paietta E: **Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012:35–42. 10.1182/asheducation-2012.1.35.
24. Jancuskova T, Plachy R, Stika J, Zemankova L, Hardekopf DW, Liehr T, Kosyakova N, Cmejla R, Zejskova L, Kozak T, Zak P, Zavrellova A, Havlikova P, Karas M, Junge A, Ramel C, Pekova S: **A method to identify new molecular markers for assessing minimal residual disease in acute leukemia patients.** *Leuk Res* 2013, **37**(10):1363–1373.
25. Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A, Menzel C, Ullmann R, Schulz MH, Erdogan F, Li N, Kijas Z, Arksteijn G, Pajares IL, Goetz-Sothmann M, Heinrich U, Rost I, Dufke A, Grasshoff U, Glaeser B, Vingron M, Ropers HH: **Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing.** *Genome Res* 2008, **18**(7):1143–1149.
26. Lu CM, Kwan J, Baumgartner A, Weier JF, Wang M, Escudero T, Munné S, Zitzelsberger HF, Weier HU: **DNA probe pooling for rapid delineation of chromosomal breakpoints.** *J Histochem Cytochem* 2009, **57**(6):587–597.
27. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Basinko A, Morel F, Le Bris MJ, Férec C, De Braekeleer M: **Using bacterial artificial chromosomes in leukemia research: the experience at the university cytogenetics laboratory in Brest.** *France J Biomed Biotechnol* 2011, **1**:329471.
28. Zakaria Z, Ahid MF, Ismail A, Keoh TS, Nor NM, Kamaluddin NR, Esa E, Yuen LK, Rahman EJ, Osman R: **Chromosomal Aberrations in ETV6/RUNX1-positive Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia using 244 K Oligonucleotide Array Comparative Genomic Hybridization.** *Mol Cytogenet* 2012, **5**(1):41.
29. Schaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (Eds): *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature.* Basel: S. Karger; 2013.

doi:10.1186/1755-8166-7-47

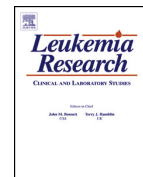
Cite this article as: Jancuskova et al.: Molecular characterization of the rare translocation t(3;10)(q26;q21) in an acute myeloid leukemia patient. *Molecular Cytogenetics* 2014 **7**:47.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





A method to identify new molecular markers for assessing minimal residual disease in acute leukemia patients

Tereza Jancuskova^a, Radek Plachy^a, Jiri Stika^a, Lucie Zemankova^a, David W. Hardekopf^a, Thomas Liehr^b, Nadezda Kosyakova^b, Radek Cmejla^a, Lenka Zejskova^a, Tomas Kozak^c, Pavel Zak^d, Alzbeta Zavrelouva^d, Pavlina Havlikova^e, Michal Karas^f, Annelore Junge^g, Christian Ramel^g, Sona Pekova^{a,*}

^a Chambon, Laboratory for Molecular Diagnostics, Prague, Czech Republic

^b Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Jena, Germany

^c University Hospital Kralovske Vinohrady, Internal Hematology Clinic, Prague, Czech Republic

^d University Hospital Hradec Kralove, IV Internal Hematology Clinic, Hradec Kralove, Czech Republic

^e University Hospital Hradec Kralove, Department of Medical Genetics, Hradec Kralove, Czech Republic

^f University Hospital Pilsen, Department of Hemato-oncology, Pilsen, Czech Republic

^g Cytogenetic Laboratory, Joint Practice of Human Genetics, Dresden, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2012

Received in revised form 20 May 2013

Accepted 5 June 2013

Available online 17 July 2013

Keywords:

Acute leukemia

Minimal residual disease

Cytogenetics

Chromosome microdissection

Next-generation sequencing

Personalized medicine

ABSTRACT

Acute leukemias (AL) comprise a heterogeneous group of hematologic malignancies, and individual patient responses to treatment can be difficult to predict. Monitoring of minimal residual disease (MRD) is thus very important and holds great potential for improving treatment strategies. Common MRD targets include recurrent cytogenetic abnormalities and mutations in important hematological genes; unfortunately well-characterized targets are lacking in many AL patients. Here we demonstrate a technical approach for the identification and mapping of novel clone-specific chromosomal abnormalities down to the nucleotide level. We used molecular cytogenetics, chromosome microdissection, amplification of the microdissected material, and next-generation sequencing to develop PCR-based MRD assays based on unique breakpoint sequences.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Acute leukemias (AL) are a heterogeneous group of hematologic disorders, generally involving two types of AL – acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML). They have varying prognoses that are reliant on timely and correct diagnosis. Because of the great biological diversity in AL, it is difficult to predict an individual patient's response to treatment. At diagnosis, approximately 50% of AML cases and 70% of ALL cases harbor clonal chromosomal abnormalities [1]. Some of these chromosomal changes result in the formation of a fusion product, which can be sensitively detected and quantified using molecular techniques, thus superseding standard cytogenetic or flow-cytometric analyses [2]. Fusion transcripts that can be monitored at the RNA level include AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1), PML-RAR α , DEK-CAN

(DEK-NUP214), and CBF β -MYH11 in AML [3], and BCR-ABL, MLL-AF4 (MLL-AFF1), E2A-PBX1 (TCF3-PBX1), TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) in ALL [4,5]. In addition to fusion transcripts, mutations of clinically relevant genes such as NPM1, CEBP α , FLT3, c-KIT, WT1 can also be identified by molecular methods [6–8]. In ALL, immunoglobulin heavy chain (IGH) and T-cell receptor (TCR) gene rearrangements are frequent targets [9].

All of these chromosomal aberrations, gene mutations and gene rearrangements can be used to sensitively and quantitatively detect residual leukemic cell populations, and thus used to monitor minimal residual disease (MRD). In recent years, several studies of childhood and adult AL cases have demonstrated MRD to be an important independent predictor of high clinical relevance. Measurement of MRD allows assessments of the quality of treatment response, duration of complete remission and prediction of the individual risk of relapse. Currently, molecular technologies based on real-time PCR have been established as being sensitive and specific, and have become the gold standard for diagnosing AL and evaluating MRD [6–10]. However, these methods are not suitable for patients in whom none of the routinely analyzed aberrations

* Corresponding author at: Chambon, Laboratory for Molecular Diagnostics, Evropska 176/16, Prague 6 16000, Czech Republic. Tel.: +420 732 517 266.
E-mail address: pekovas@post.cz (S. Pekova).

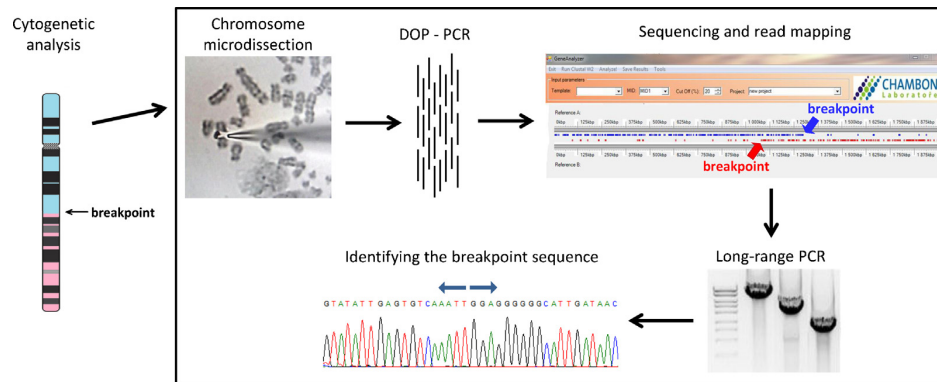


Fig. 1. Outline of procedure to identify breakpoints. Cytogenetic analysis is followed by microdissection of the derivative chromosome, then amplification and sequencing of the dissected material.

have been identified. In our laboratory, such patients comprise about 5% of the total diagnostic samples received. It is therefore highly desirable to identify new clone-specific markers of leukemic cells to follow up MRD in such patients.

The aim of our study was to develop a technique allowing us to identify new unique clone-specific markers at the cytogenetic level and characterize them down to the molecular level (specific nucleotide sequence). Briefly, chromosomal aberrations were identified using molecular cytogenetic techniques, these aberrations were then microdissected, the resulting DNA fragments were whole-genome amplified, and using next-generation sequencing precise mapping of the novel chromosomal breakpoints at the nucleotide level was performed (Fig. 1). This combined approach allowed us to design real-time MRD PCR assays based on unique genetic markers of AL blasts in order to specifically and sensitively monitor the dynamics of the malignant clone in response to patient treatment.

2. Materials and methods

2.1. Cell line and patient samples

In a pilot study of the method, the cell line K562 (ATCC, USA) was used. This cell line harbors a der(10)t(3;10)(p21.3;q23) that was microdissected and analyzed to test the methodology. This breakpoint has already been characterized using molecular cytogenetic techniques [11], but the sequence of the breakpoint has not yet been identified. Then, we obtained bone marrow or peripheral blood samples from 3 patients or 1 patient, respectively, harboring various chromosomal abnormalities at the time of diagnosis and following treatment. Bone marrow aspirates and peripheral blood sampling were performed upon written informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki.

2.2. Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis

Bone marrow samples were separated on a Histopaque (Sigma, Germany) density gradient. Approximately 10 million cells from the mononuclear fraction were cultivated for 24 h in RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin/streptomycin and L-glutamine (all from PAA Laboratories, Austria) at 37 °C/5% CO₂. Whole peripheral blood was cultivated for 72 h in the same media supplemented by the stimulant PHA. Cells were harvested according to standard cytogenetic methods – colcemid treatment (0.1 µg/ml) (Gibco, UK), hypotonic treatment with 0.075 M KCl and fixed in 3:1 methanol:acetic acid. Cells from the K562 cell line were cultivated in the same medium as described above to the exponential growth phase, and then harvested in the same manner as bone marrow samples.

The karyotypes of the patients and the K562 cell line were investigated and breakpoints identified using a combination of standard G-banding, multiplex fluorescence in situ hybridization, and multicolor chromosome banding (mFISH and mBAND probe sets, MetaSystems, Germany) as appropriate. Hybridization and post-hybridization steps were carried out according to the manufacturer's protocols. Analysis of mFISH and mBAND was performed with an Axio Imager.Z2 fluorescence microscope (Zeiss, Germany) and Isis v 5.4 software (MetaSystems, Germany). For both the patients and the cell line, at least 20 metaphases were analyzed.

2.3. Chromosome microdissection and amplification

Regions around the breakpoints of derivative chromosomes were microdissected as previously described [12,13]. In brief, metaphase chromosome spreads on coverslips were identified either by Giemsa staining or using locus specific FISH probes to identify the derivative chromosomes. Aberrant target chromosomes were dissected by glass microneedles manipulated by an electronic micromanipulator using an inverted microscope (Axiovert 10, Zeiss, Germany). Microdissected fragments were collected in a collection solution [14] and then subjected to amplification by degenerate oligonucleotide-primed (DOP) PCR [15]. A minimum of 6 fragments were dissected for each patient and the K562 cell line. Before preparing the 454 library for next generation sequencing, the specificity of amplified DNA was verified by dye-labeling an aliquot of DOP-PCR product and subsequent hybridization to control metaphase chromosomes (reverse FISH) [16].

2.4. Next generation sequencing

Amplified DNA fragments were sequenced on a GS Junior system (Roche, Germany). 500 ng of DNA from the DOP-PCR was purified using a Gel Extraction Kit followed by a MinElute PCR purification kit (both Qiagen, Germany). 454 library preparation, clonal amplification (using the emPCR Lib-L Kit for the GS Junior, Roche, Germany) and sequencing were carried out according to the manufacturer's protocol.

2.5. Bioinformatic analysis of sequence reads – GeneAnalyzer software

Sequence reads from the GS Junior runs were analyzed using software developed in our lab, named Breakpoint Locator (R. Plachy, unpublished). This software enables individual reads to be mapped to a reference chromosome sequence (NCBI build 37.3), using the BLAST+ version 2.2.26 algorithm for determining homology. One of the main features of this program is the ability to combine information on homology and the position of individual sequence reads to the reference sequence. Parameters including percent homology, minimum length to be considered positive, and minimal difference in homology can be user-adjusted to maximize the number of used reads with the minimal possible false-positive matches.

2.6. DNA/RNA isolation, reverse transcription and long-range PCR (LR-PCR)

DNA and/or RNA were isolated from whole peripheral blood and the mononuclear fraction of bone marrow samples from patients at diagnosis and later during treatment for the MRD follow-up. DNA was isolated on a MagNA Pure automatic isolator (Roche, Germany) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using the VersoRT Blend system (AB-gene, UK) according to the manufacturer's instructions.

To exactly identify a breakpoint region, the sequences of each respective chromosome on either side of the breakpoint where sequence reads ultimately matched were used to design primers for long-range PCR. The LR-PCR primers hybridized approximately every 1500 nucleotides along the respective chromosome within the last approximately 10,000 nucleotides before the putative breakpoint. Primer pairs for both partner chromosomes were then used for LR-PCR, and the shortest resulting amplicon sequenced from both sides using standard Sanger sequencing (Fig. 2). Primers for LR-PCR were designed in Vector NTI (v 11.5, Invitrogen). PCR amplification was done using the Expand Long Range dNTPack kit (Roche, Germany). The reaction mix contained 200 ng DNA, 5 U Expand Long Range Enzyme Mix, 5% DMSO, 1× Expand Long Range Buffer with MgCl₂, 500 µM each dNTPs and 0.4 µM each primer in a 50 µl final volume. Amplification conditions were: 8 min at 92 °C;

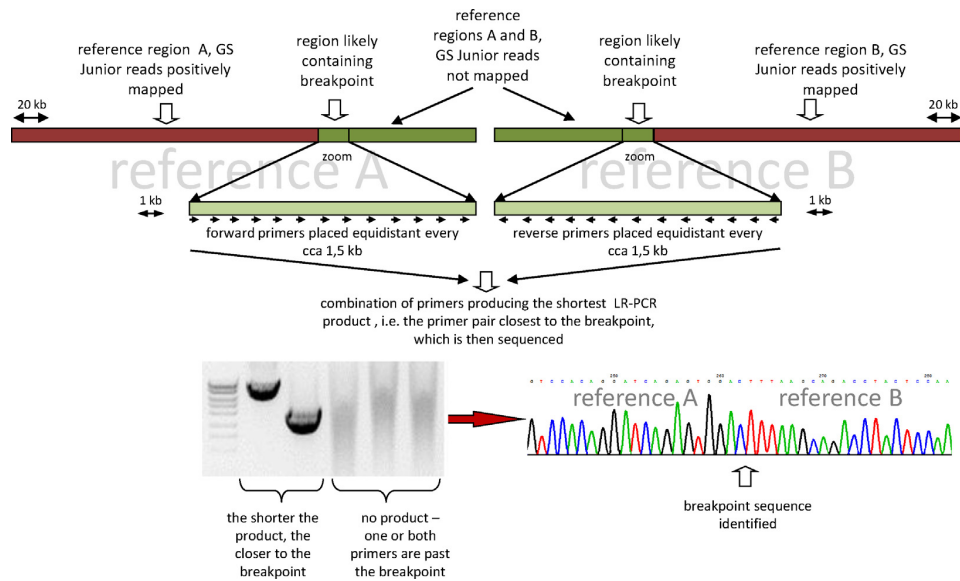


Fig. 2. Detail of the procedure using mapped sequence reads to design PCR primers for LR-PCR and subsequent sequencing of the amplicon spanning the breakpoint.

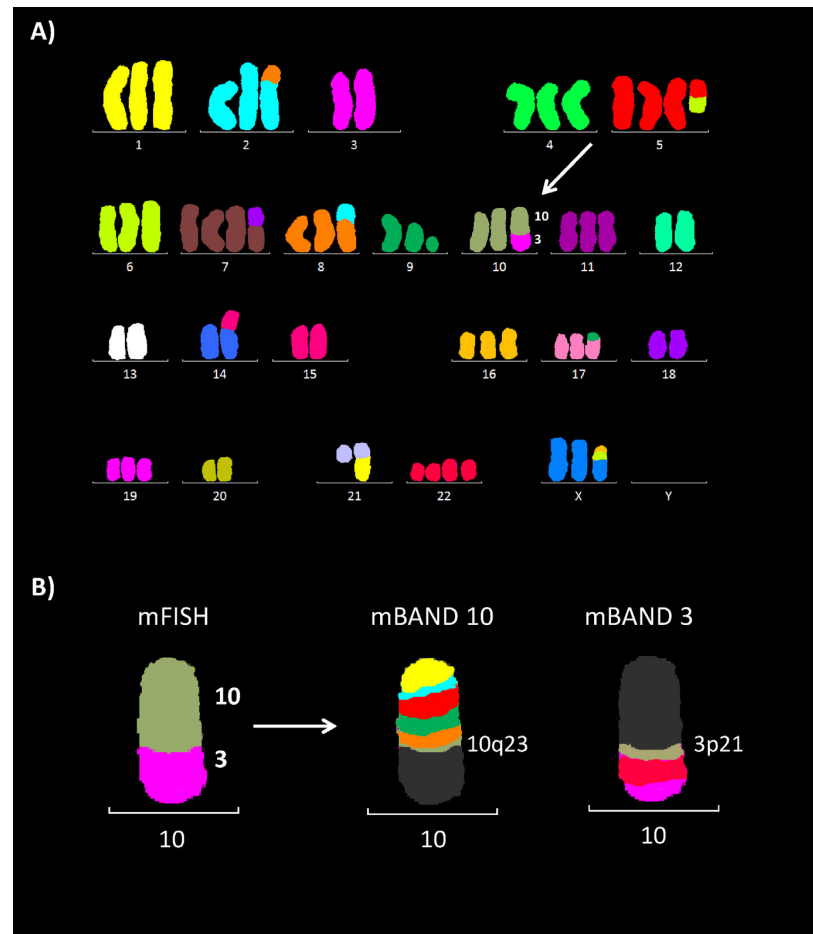


Fig. 3. Molecular cytogenetic analysis of K562 cell line. (A) mFISH analysis and (B) analysis of der(10) using for mBAND probes for chromosomes 3 and 10.

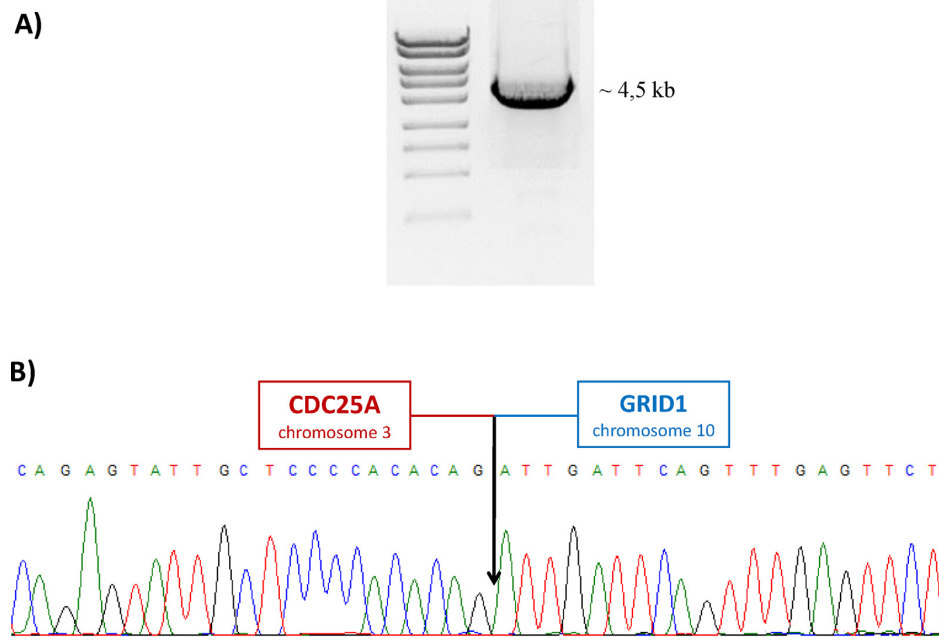


Fig. 4. (A) Results of LR-PCR with a primer pair spanning the breakpoint of the der(10) and (B) Sequence of the amplicon from LR-PCR, showing nucleotide sequence change from locus CDC25A on chromosome 3 to locus GRID1 on chromosome 10.

followed by 35 cycles of 92 °C/30 s, 58 °C/30 s, and 68 °C/6 min. 10 µl of the PCR was run on a 0.7% agarose gel to check the quality of the PCR products.

2.7. Design of real-time PCR assays to monitor MRD

Based on the sequence of the unique genomic abnormalities identified using the above procedure, a set of primers and a TaqMan fluorescently labeled hybridization probe (MWG, Germany) were designed using the Vector NTI software, producing an amplicon within the range of 100–150 bp. The resulting PCR product was molecularly cloned using the standard T/A cloning technique (TOPO T/A cloning kit, Invitrogen, UK) according to the manufacturer's instructions. Plasmids were purified using a QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. A calibration curve using serial dilution of the cloned plasmid standard was constructed to assess the technical parameters of the assay (slope, *R* value, intercept) needed for correct calculation of the relative quantity of the target of interest. As control genes, ABL (RNA level) or ALBUMIN (DNA level) were used. Sensitivity limits of 10^{-4} to 10^{-5} were achieved for each of the novel abnormalities tested. MRD follow-up using real-time PCR was performed on a Rotorgene Q (Qiagen, Germany) platform. Each sample was analyzed in triplicates.

3. Results

3.1. K562 cell line

As a proof of principle, we started with the K562 cell line in a pilot study. Using mFISH and mBAND/MCB, we confirmed the existence of the der(10)t(3;10)(p21.3;q23) (Fig. 3). The chromosomal DNA around the breakpoint was microdissected from 11 derivative chromosomes and subjected to DOP-PCR amplification. After library construction and GS Junior sequencing, 80,798 reads were obtained and analyzed in GeneAnalyzer using chromosomes 3 and 10 as reference sequences. Since DNA from chromosome 3 beyond the p21.3 breakpoint and chromosome 10 beyond the q23 breakpoint were not present in the sequenced material, the number of reads matched to these reference chromosomes dropped dramatically at these positions. In this way, we were able to estimate the positions of the last mapped reads belonging to either chromosome 3 or 10, respectively, before the breakpoint. Primer pairs for both

partner chromosomes were then used for LR-PCR, with one of these pairs resulting in a 4.5 kb product (Fig. 4). This amplicon was then sequenced from both sides using standard Sanger sequencing. The resulting sequence confirmed the presence of both chromosome 3 and 10 material, and identified the precise location of the breakpoint – in the genes CDC25A on chromosome 3 (intron 2) and GRID1 on chromosome 10 (intron 4) (Fig. 4).

3.2. Patient 1

The karyotype of patient 1 at the time of diagnosis was determined using mFISH and mBAND as 46,XX,t(X;4;11)(q25;q21;q23), indicating the presence of an MLL-AF4 gene fusion (Fig. 5). This fusion was confirmed by a real-time PCR assay [10] and sequence-analyzed (data not shown). Both the derivative 11 and derivative 4 chromosomes were subjected to the same procedure as described above for the K562 cell line. Sequencing of these fragments resulted in 122,279 and 120,209 reads for the der(4) and der(11), respectively. Subsequent mapping, design of LR-PCR primers, and LR-PCR were performed as above, and resulted in amplicons of ~0.5 kb across the der(4) and ~3.0 kb across the der(11) breakpoints (Fig. 6). Sanger sequencing of these LR-PCR products identified the exact breakpoints of the chromosomal fusion partners. As expected, the derivative 11 resulted in a MLL (intron 9) and AF4 (intron 5) fusion (Fig. 7). The derivative 4 contained a fusion between the pseudogene LOC392539 from chromosome X and the AF4 gene at 4q21. An example of read mapping of the der(4) breakpoint using GeneAnalyzer is shown in Fig. 8. To test the applicability of this newly-characterized breakpoint in the der(4) as a marker for MRD follow-up, a real-time PCR assay was designed and compared to quantitation based on the MLL-AF4 fusion at the DNA level and the MLL-AF4 fusion at the RNA level for patient samples at diagnosis and over the course of treatment (Fig. 9). These assays clearly show that all of these targets are fully comparable and equally sensitive.

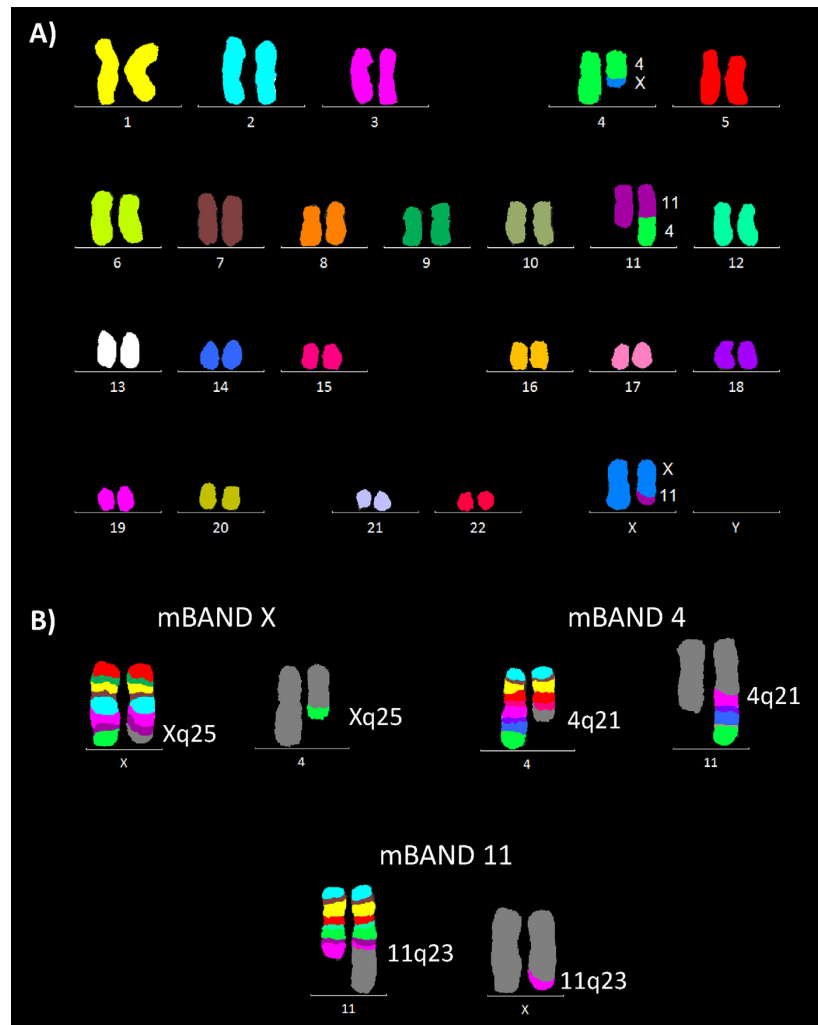


Fig. 5. Molecular cytogenetic analysis of diagnostic patient bone marrow sample. (A) mFISH and (B) mBAND.

3.3. Patients 2–4

Patient 2 was determined by mFISH and mBAND/MCB to have a karyotype at diagnosis of 46,XY,ins(10;11)(p12;q13q23);t(11;14)(q13;p11), with an MLL-AF10 fusion (Fig. 10). The expression of this fusion was low, however, limiting the dynamic range of the standard PCR assay based on the RNA fusion product. Therefore, we dissected and sequenced this breakpoint as described above, and precisely mapped the breakpoint in MLL intron 8 and AF10 intron 10. This allowed us to design a high-sensitivity MRD assay based on the patient's DNA. For the next patient in this study (Patient 3), neither cytogenetic nor molecular analyses revealed the presence of a routinely analyzed aberration that could be used as a target for MRD follow-up. However, this patient had a clone with a novel cytogenetic aberration, with the karyotype 46,XY,der(7)del(7)(p21)del(7)(q21),t(7;8)(q21;q24) determined by mFISH and mBAND/MCB analyses (Fig. 11). Again, microdissection and sequencing allowed us to identify the breakpoint of the derivative chromosome 8 (Fig. 11), and to design a real-time PCR assay for this patient. Patient 4 had a karyotype determined by G-banding as 46,XY,inv(3)(q13.1;q26.1) (Fig. 12). Because of the nature of the read-mapping strategy we use, great

care needed to be taken to only dissect DNA in the immediate surroundings of one of the breakpoints. If the material had been taken covering both breakpoints, then the mapping to the reference sequence would not have been differentiable from a normal chromosome 3. We thus dissected just the more telomeric breakpoint. Amplification high-throughput sequencing, mapping, and long-range PCR proceeded as above, and we were able to successfully resolve the nucleotide sequence around the breakpoint. 6 nucleotides at the breakpoint were identical for both sides of the breakpoint, meaning that these nucleotides could not definitively be assigned to 3q13.1 versus q26.1 (Fig. 12).

4. Discussion

A specific real-time PCR assay for detecting MRD in AL enables precise monitoring of malignant cell populations in patients, and allows treatment regimens to be evaluated. For this reason, MRD follow-up in AL patients during the course of their treatment has important clinical significance. The aim of our study was to use a combination of cytogenetic and molecular techniques to identify new clone-specific markers of leukemic cells in patients with

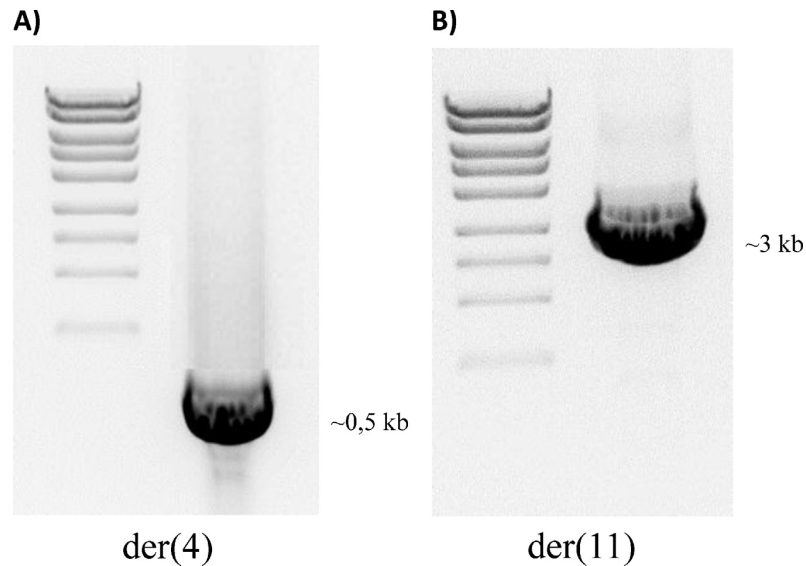


Fig. 6. Results of LR-PCR with primer pairs spanning breakpoints of (A) the der(4) and (B) the der(11) of the diagnostic patient bone marrow sample.

AL for whom standard screening panels fail to detect a recurrent molecular marker. This method for finding and precisely identifying a unique clone-specific aberration at the nucleotide level allows subsequent real-time PCR MRD monitoring. Traditional cytogenetic analysis (chromosome banding) has important prognostic significance, but is limited in the sensitivity in which residual leukemic cells can be detected. Karyotyping is also limited by the necessity of obtaining sufficient analyzable metaphases. Molecular cytogenetic examination using FISH is more sensitive, and allows more cells to be analyzed than in classic cytogenetic karyotyping.

Immunophenotype analysis of the expression of CD antigens on leukemic cells using flow cytometry (FCM) is an integral part of both the diagnosis and monitoring of treatment in patients with AL [8,17]. However, FCM analysis of leukemic clones might be hampered by the fact that leukemic cells can change their surface markers during treatment [5,17]. Depending on the type of leukemia, instrument used, and antibody panel used for detection, the sensitivity of flow cytometry ranges from 10^{-3} to 10^{-4} . PCR-based methods are currently the most sensitive techniques for MRD follow-up, reaching sensitivities of 10^{-4} – 10^{-5} [5,8,17]. The

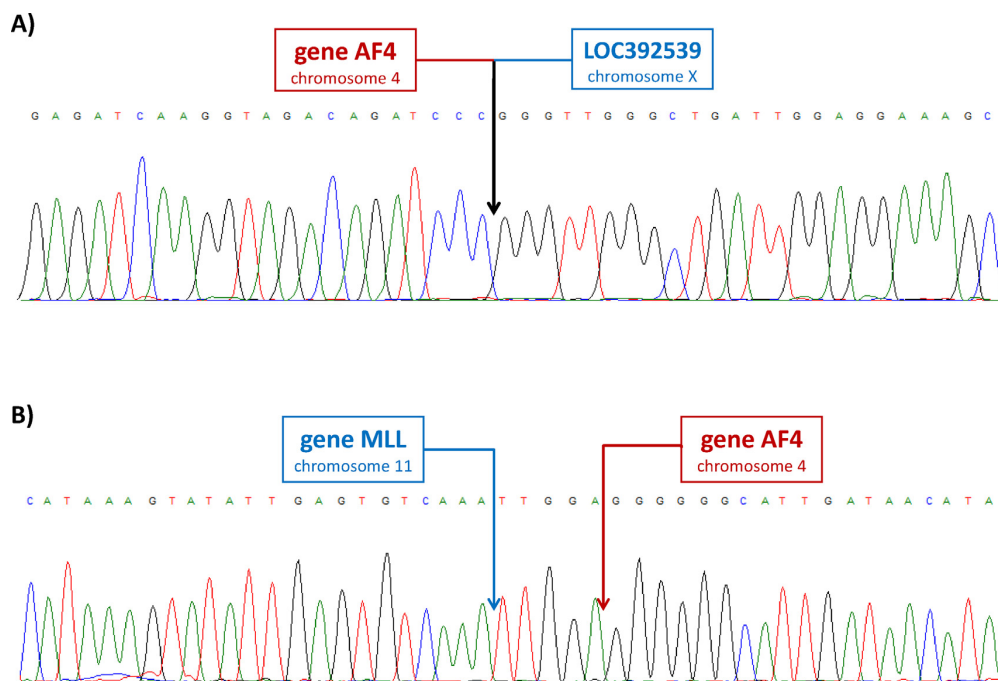


Fig. 7. Sequences of breakpoint-spanning amplicons from: (A) the der(4), showing a fusion of AF4 (intron 5) from chromosome 4 and the pseudogene LOC392539 from chromosome X; and (B) the der(11) showing a fusion of the MLL gene (intron 9) from chromosome 11 and the AF4 gene (intron 5) from chromosome 4.

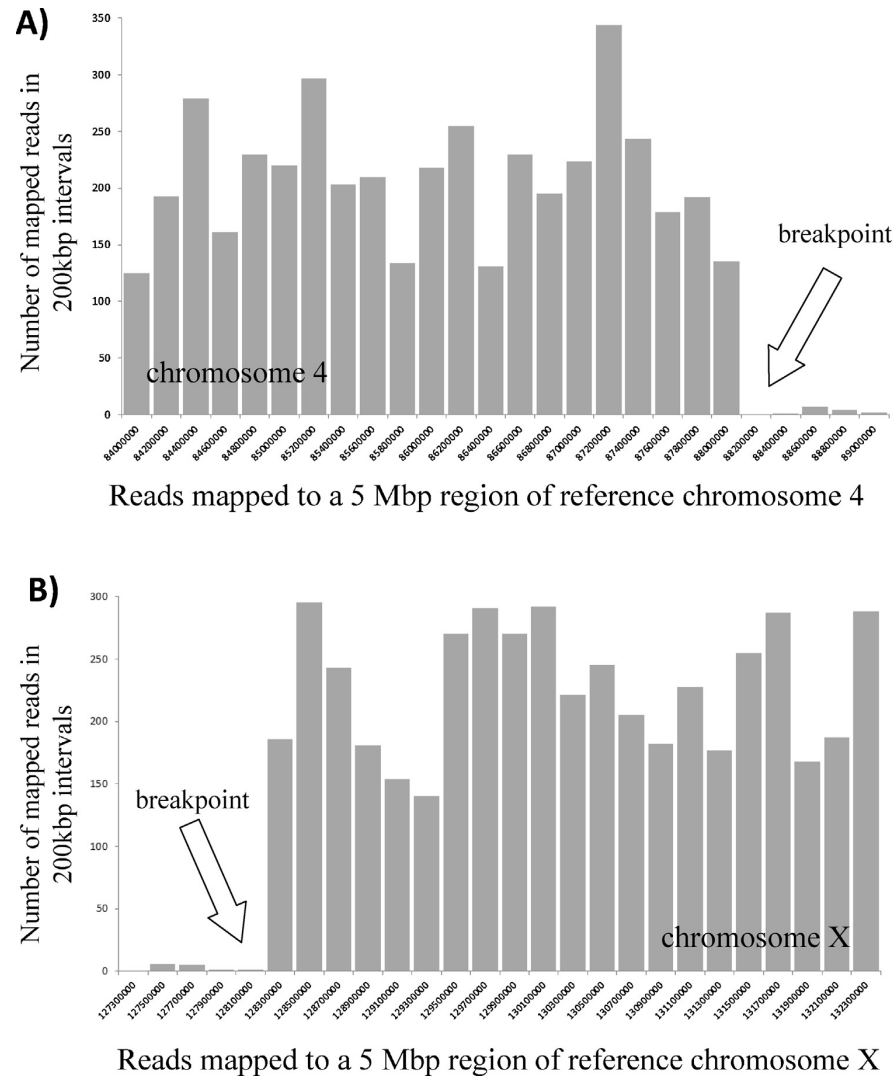


Fig. 8. Results of analysis from GeneAnalyzer software showing reads mapped to regions of (A) reference chromosome 4, and (B) reference chromosome X. Reads were obtained from GS Junior sequencing of DNA microdissected from the der(4) of the diagnostic patient bone marrow sample. Beyond the putative breakpoint, reads matched to each respective chromosome markedly drop in number, reflecting the fact that material from that chromosome has been translocated elsewhere. A few matched reads past the breakpoint are due to repetitive sequences.

prognostic importance of detecting MRD by quantitative real-time PCR has been demonstrated in many studies [5,18–21]. In a modern diagnostic setting, targets for monitoring MRD in patients with AL include fusion transcripts, clone-specific mutations of prognostic markers associated with leukemia, and IGH and T cell receptor rearrangements. These can be identified in up to 97% of adult AML patients [22] and 70–95% of ALL patients [23]. However, particularly in AML, many of these are point mutations or small deletions that are extremely difficult to design highly-sensitive real-time PCR assays for. Or, as with our Patient 2, some common fusions still pose problems when designing assays. In this case, the low expression of the fusion product at the RNA level prevented its use in a high-sensitivity MRD assay. MLL fusions at the DNA level can sometimes be resolved using inverse PCR techniques, but in this patient there were difficulties finding restriction sites allowing this technique to be utilized. With the microdissection and next-generation sequencing methodology outlined here, such targets as well as novel chromosomal aberrations can be used as specific

targets for the highly sensitive detection and quantification of MRD at the molecular level. In our experience, about 5% of AML patients lack one of the commonly tested targets for MRD, and about half of these have novel chromosomal aberrations. Especially for younger patients who may be followed-up for longer periods of time after treatment, having a clone-specific marker would be a great advantage.

Mapping chromosome breakpoints is a conventional method for identifying specific genes in leukemic patients, as well as patients with solid tumors and individuals with balanced translocations [24–26]. A fundamental requirement is the ability to karyotype and precisely identify derivative chromosomes. Classic karyotyping generally has a resolution of about 7–10 Mb, while molecular cytogenetic tools such as mFISH and mBAND increase this to about 2 Mb [27,28]. This resolution is of course still inadequate for precise identification of breakpoints. Hybridization with even higher-resolution, such as BAC-FISH (Bacterial Artificial Chromosome FISH) can help to narrow-down the chromosomal breakpoints

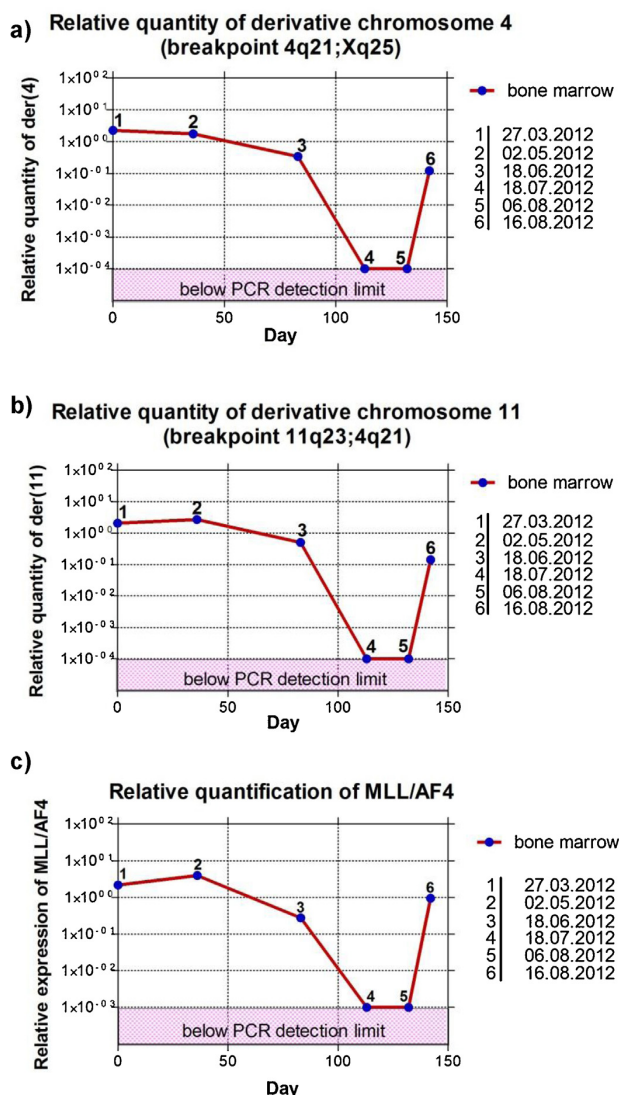


Fig. 9. Results from quantitative real-time PCR of bone marrow samples from the patient at diagnosis and over the course of treatment. Assays were designed using sequences of (A) the der(4); (B) the der(11); and (C) the MLL-*AF4* fusion transcript.

further, though it is still not subtle enough to allow subsequent molecular methods to be used. There have been a number of methods proposed to address this issue, with varying strengths and weaknesses. Array CGH has improved in resolution, allowing deletions, amplifications, and non-balanced translocations to be more precisely characterized, but array CGH in principle cannot detect targets arising from balanced chromosomal translocations [29]. Sequence capture and subsequent high-throughput sequencing of target regions could identify aberrations leading to molecular targets, but the region to capture must first be identified by other methods, and new capture arrays are required for each novel aberration to be studied. Next generation sequencing can be used to both identify targets and perform subsequent follow-up of MRD, i.e. amplicon ultra deep sequencing [30]. However, in our experience both timing and cost considerations make this method disadvantageous compared to having a patient-specific real-time PCR assay available. In particular, amplicon ultra deep sequencing must be performed each time a patient's sample comes to the lab for

follow-up. While multiplexing patient samples may lead to increased cost effectiveness, it also increases the time-to-result for individual patients.

Microdissection is commonly used to prepare chromosome-specific DNA libraries, painting probes, and to identify marker chromosomes [31–33], as well as for breakpoint mapping [34]. For successful dissection, sufficient numbers of well-spread metaphase chromosomes that can be properly identified by either classical staining techniques (e.g. G-banding using Giemsa) [35] or the use of fluorescent probes are needed. While laser microdissection is rapid and precise, the limited resolution of commercially available systems makes it difficult to dissect interstitial parts of chromosomes, and thus breakpoint mapping requires either subsequent hybridization to arrays [36], accompanying FISH and PCR-based mapping [37] or large-scale high-throughput sequencing of large chromosome regions. Flow cytometry could also be used to isolate derivative chromosomes, but is not applicable in cases where derivative chromosomes do not significantly differ in size from normal. Here, we used a combination of manual glass-needle microdissection and next generation sequencing to overcome these limitations by allowing the precise dissection of the aberrant region of interest, with only about 20–40 Mbp of DNA dissected.

After whole genome amplification of the microdissected material by DOP-PCR, libraries and sequencing was performed on the GS Junior platform. In studies by Chen et al. [24,38], the Illumina 1G (Solexa) platform was used to sequence entire derivative chromosomes, with up to a million reads of about 200 bp median length. The GS Junior runs in our study resulted in about 100,000 reads, but with median length of about 400 bp. This longer read length allowed more precise mapping of reads, enabling a greater proportion of reads to be used in locating the breakpoint, especially in regions of lower sequence complexity.

When read mapping allowed us to identify the breakpoint region to within a few kilobases, long-range PCR was then used to produce amplicons containing the breakpoint of interest. By selecting primers an appropriate distance apart (in our case ~1500 bp) on either side of the putative breakpoint, only a limited number of primer pair combinations is necessary to produce an amplicon spanning the breakpoint, which is amenable to direct Sanger sequencing to precisely identify the nucleotide sequence of the breakpoint. Based on the sequence of the unique clone-specific breakpoint, the ultimate step is to design a real-time PCR assay to enable MRD monitoring.

There are some limitations to the method outlined here. One problem is the lack of reference sequences between some contigs, and in subtelomeric and centromeric regions. Translocations occurring in these regions would not be able to be successfully mapped. Some molecularly complex aberrations (e.g. insertions below the detection limit of molecular cytogenetic methods or paracentric inversions) would also not be amenable to this method. Another issue is the stability of newly identified molecular markers over the course of treatment. Ideally, the aberration chosen for microdissection should be present in the mainline and all subclones, or if possible multiple aberrations should be targeted to provide several independent markers. The stability of any marker in a particular patient can be influenced by clonal evolution, so correlations with other clinical, biochemical, and hematological parameters as well as flow cytometric and cytogenetic analysis is always required.

The combination of cytogenetic and molecular methods described here enabled us to proceed from the chromosomal level (cytogenetically identified unique marker) to the molecular level (unique DNA sequence). Using this procedure, many chromosomal translocations can be used to identify a target for detecting and quantifying MRD. Alternatively, this method can be used to quickly and directly resolve many types of congenital or acquired chromosomal aberrations. As opposed to other

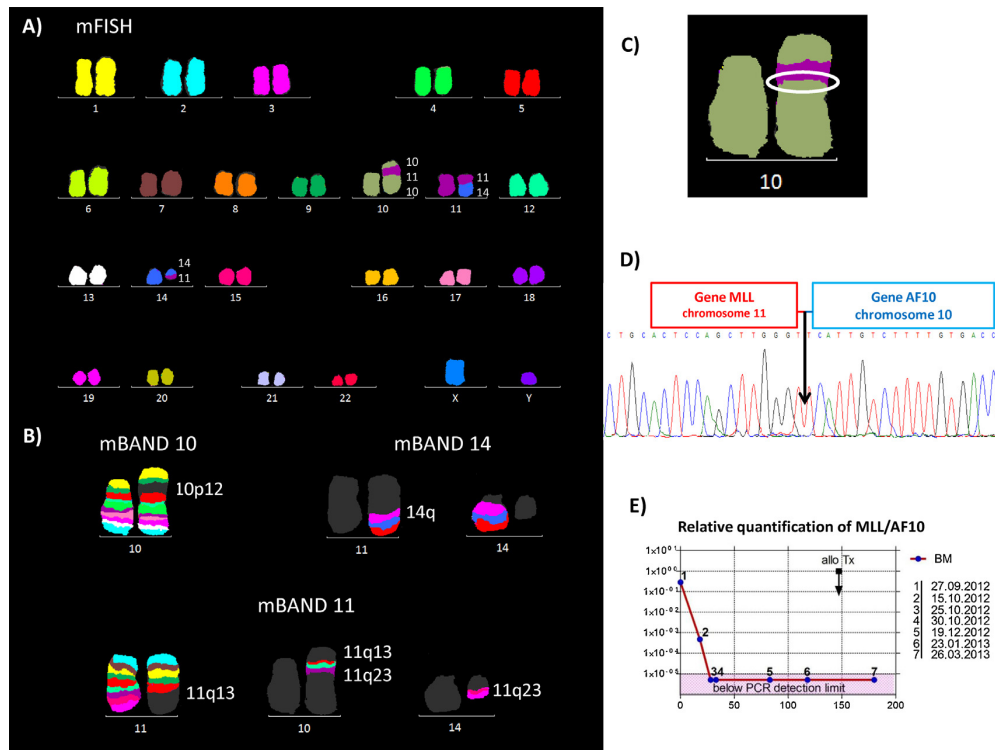


Fig. 10. In patient 2, the karyotype at diagnosis, determined by mFISH (A) and mBAND/MCB analyses (B), showed 46,XY,ins(10;11)(p12;q13q23);t(11;14)(q13;p11). The ins(10;11), (C) was selected for the microdissection and subsequent molecular analysis. The MLL-AF10 fusion was revealed (D). Given its stability and robustness at the DNA level, the MLL-AF10 fusion was further used for the MRD follow-up.

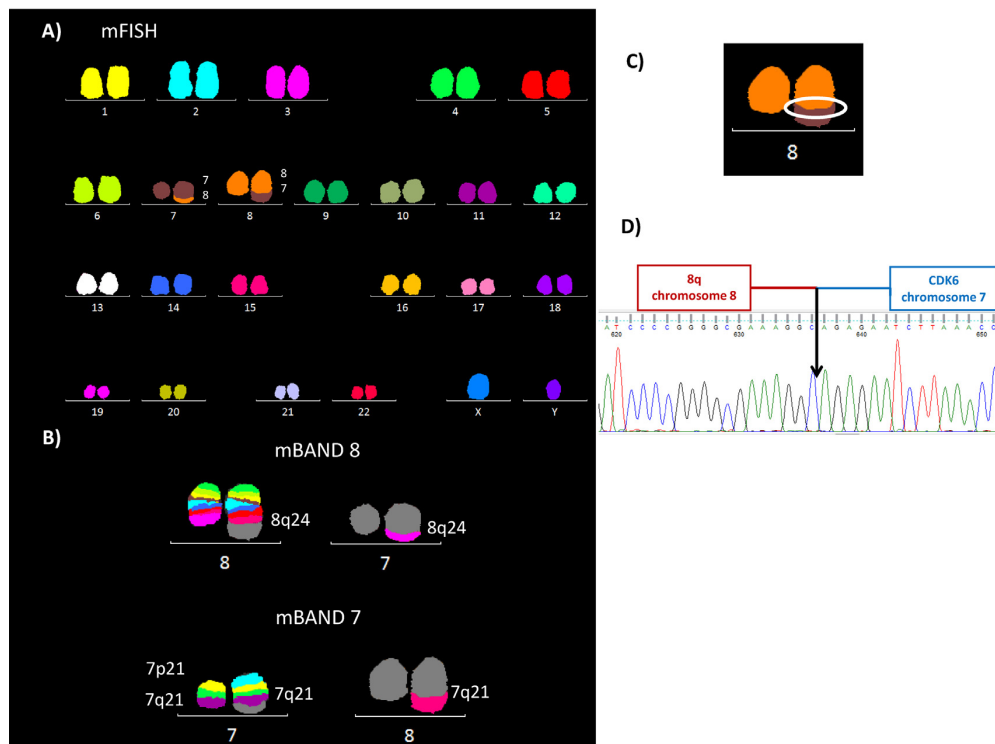


Fig. 11. In patient 3, the karyotype at diagnosis, determined by mFISH (A) and mBAND/MCB analyses (B), showed 46,XY,der(7)del(7)(p21)del(7)(q21),t(7;8)(q21;q24). The t(7;8), (C) was selected for the microdissection approach. Sanger sequencing revealed the precise breakpoint at the nucleotide level (D). This sequence will be prospectively used for the MRD follow-up in this newly diagnosed AL patient.

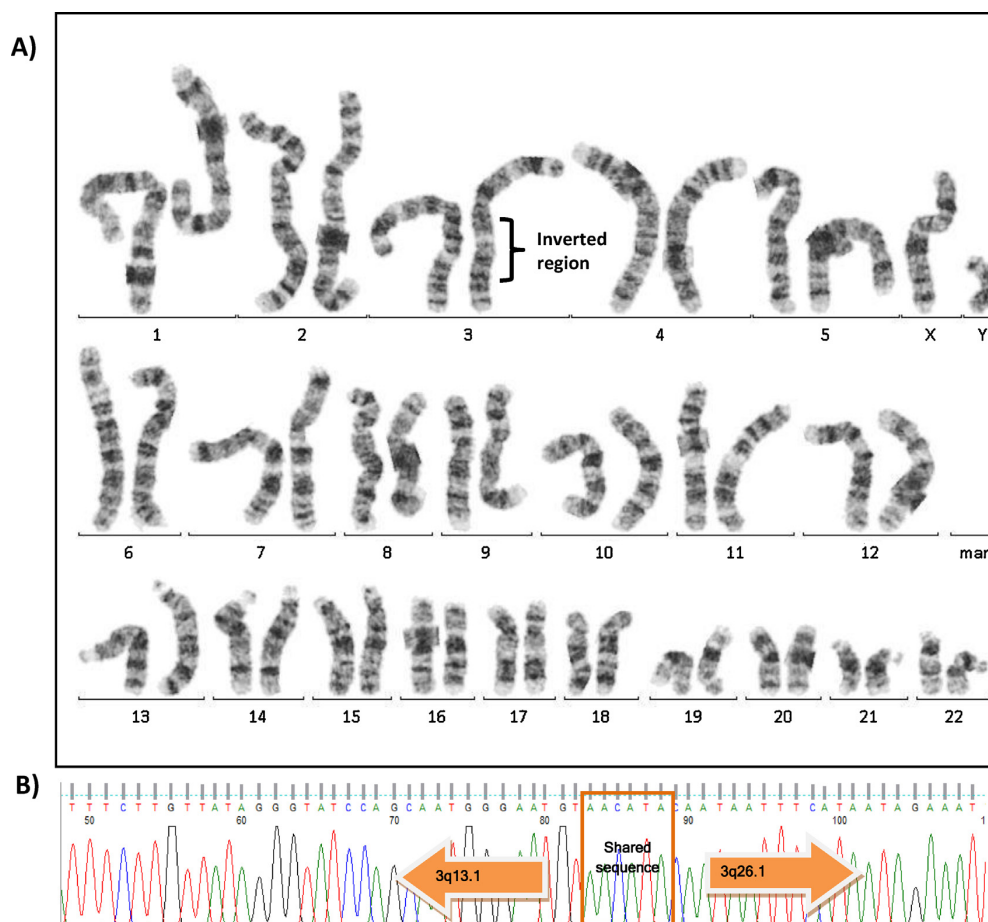


Fig. 12. In patient 4, the karyotype at diagnosis, determined by G-banding (A), showed 46,XY,inv(3)(q13.1;q26.1). The inverted region of chromosome 3 was selected for the molecular analysis and the exact nucleotide sequence of the breakpoint was identified (B).

breakpoint mapping methods such as array CGH or FISH mapping, our technique allows researchers to rapidly map breakpoints down to the nucleotide level, immediately elucidating possible genes involved and even the type of mutation present. This can be invaluable for studying such aberrations in a wide variety of fields, such as the evolution of diseases or the genetic basis of inherited syndromes.

While the microdissection of chromosomes can be technically challenging and requires experience, the equipment involved is not complex and subsequent molecular biological methods are routine in most modern laboratories. Next-generation sequencing equipment is also becoming more common and prices for analyses should continue to fall. A great advantage is that once an MRD assay for a particular patient has been designed, the follow-up of that patient requires just standard real-time PCR and results are available within hours.

Our work clearly shows that moving from the chromosomal level to the nucleotide level is feasible and readily applicable for eligible AL patients. In addition, this method can be used to rapidly elucidate chromosomal aberrations in other types of patients, such as those with congenital translocations. The time required for the entire procedure under reasonable standard conditions, from receiving the diagnostic sample to developing the real-time MRD assay, is approximately up to six weeks, allowing its use in clinical practice as a tool for personalized medicine in hemato-oncology.

Funding source

The work was supported in part by the Stefan-Morsch-Stiftung and the Monika-Kutzner-Stiftung, Germany, given to TL; and by Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic, Grant FR-TI2/579, given to SP.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors wish to thank Martina Snajdrova for her excellent technical assistance.

Contributions: TJ, RP, JS, LZ, DWH, NK, AJ, CR and LZ designed and carried out the experiments, analyzed data and wrote the manuscript. RC, SP designed experiments, supervised the work and wrote the manuscript. TK, PZ, PH and MK analyzed clinical data and wrote the manuscript.

References

- [1] Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004;18:115–36.
- [2] Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008;112(January (1)):4–16.

- [3] Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116:354–65.
- [4] Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2009;113:4153–62.
- [5] Brüggemann M, Gökbuget N, Kneba M. Acute lymphoblastic leukemia: monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. *Semin Oncol* 2012;39:47–57.
- [6] Cairoli R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB, et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* 2006;107:3463–8.
- [7] Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358:1909–18.
- [8] Rossi G, Minervini MM, Carella AM, de Waure C, di Nardo F, Melillo L, et al. Comparison between multiparameter flow cytometry and WT1-RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets. *Leuk Res* 2012;36:401–6.
- [9] Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:7–12.
- [10] Plachy R, Zejskova L, Cmejla R, Hardekopf DW, Jancuskova T, Krutilkova L, et al. Five-color multiplex Real-Time PCR technology to detect over 75 recurrent chromosomal abnormalities in acute myeloid leukemia: benefits for minimal residual disease detection. *Blood* 2011;118:1083 [abstract 2526].
- [11] Naumann S, Reutzel D, Speicher M, Decker H. Complete karyotype characterization of the K562 cell line by combined application of G-banding, multiplex-fluorescence in situ hybridization, fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization. *Leuk Res* 2001;25:313–22.
- [12] Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, et al. Molecular definition of high resolution multicolor banding (MCB) probes: first within the human DNA-sequence anchored fish-banding probe set. *J Histochem Cytochem* 2008;56:487–93.
- [13] Yang F, Trifonov V, Ng BL, Kosyakova N, Carter NP. Generation of paint probes by flow-sorted and microdissected chromosomes. In: Thomas Liehr, editor. *Fluorescence in situ hybridization (FISH) – application guide*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. p. 35–52.
- [14] Weimer J, Kiechle M, Senger G, Wiedemann U, Ovens-Raeder A, Schuierer S, et al. An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. *Chromosome Res* 1999;7(5):355–62.
- [15] Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 1992;13:718–25.
- [16] Liehr T, Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, et al. Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res* 2002;97:43–50.
- [17] Craig F, Foon K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008;111:3941–67.
- [18] Schnittger S, Weissner M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFBMYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003;102:2746–55.
- [19] Weissner M, Kern W, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukemia during therapy. *Haematologica* 2005;90:881–9.
- [20] Perea G, Lasa A, Aventín A, Domingo A, Villamor N, Queipo de Llano MP, et al. Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)]. *Leukemia* 2006;20:87–94.
- [21] Abdelhamid E, Preudhomme C, Helevaut N, Nibourel O, Gardin C, Rousselot P, et al. Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2012;36:316–23.
- [22] Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Rognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(12):1079–89.
- [23] van der Velden VH, van Dongen JJ. MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol* 2009;538:115–50.
- [24] Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A, Menzel C, Ullmann R, Schulz MH, et al. Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing. *Genome Res* 2008;18:1143–9.
- [25] Lu CM, Kwan J, Baumgartner A, Weier JF, Wang M, Escudero T, et al. DNA probe pooling for rapid delineation of chromosomal breakpoints. *J Histochem Cytochem* 2009;57:587–97.
- [26] De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Basinko A, Morel F, Le Bris MJ, Férec C, et al. Using bacterial artificial chromosomes in leukemia research: the experience at the university cytogenetics laboratory in Brest, France. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:329471.
- [27] Bickmore WA. Karyotype analysis and chromosome banding, 2001; eLS. disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008;112:4–16.
- [28] Mundle SD, Koska RJ. Fluorescence in situ hybridization: a major milestone in luminous cytogenetics. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, editors. *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian*. 2nd ed. New Jersey: Humana Press; 2006. p. 189–201.
- [29] Zakaria Z, Ahid MF, Ismail A, Keoh TS, Nor NM, Kamaluddin NR, et al. Chromosomal aberrations in ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia using 244 K oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Mol Cytogenet* 2012;5:41.
- [30] Kohlmann A, Grossmann V, Nadarajah N, Haferlach T. Next-generation sequencing – feasibility and practicality in haematology. *Br J Haematol* 2013;160(6):736–53.
- [31] Engelen JJ, Albrechts JC, Hamers GJ, Geraedts JP. A simple and efficient method for microdissection and microFISH. *J Med Genet* 1998;35:265–8.
- [32] Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, et al. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 2002;9(4):335–9.
- [33] Shim SH, Kyhm JH, Chung SR, Kim SR, Park MI, Lee CH, et al. Generation of FISH probes using laser microbeam microdissection and application to clinical molecular cytogenetics. *J Microbiol Biotechnol* 2007;17:1079–82.
- [34] Roberts I, Foster N, Nacheva E. Paint-assisted microdissection-FISH: rapid and simple mapping of translocation breakpoints in the embryonal rhabdomyosarcoma cell line RD. *Cytometry* 2004;58A:177–84.
- [35] Grossmann V, Höckner M, Karmous-Benailly H, Liang D, Puttinger R, Quadrelli R, et al. Parental origin of apparently balanced de novo complex chromosomal rearrangements investigated by microdissection, whole genome amplification, and microsatellite-mediated haplotype analysis. *Clin Genet* 2010;78:548–53.
- [36] Obenauf AC, Schwarzbraun T, Auer M, Hoffmann EM, Waldispuehl-Geigl J, Ulz P, et al. Mapping of balanced chromosome translocation breakpoints to the basepair level from microdissected chromosomes. *J Cell Mol Med* 2010;14(8):2078–84.
- [37] Gotter AL, Nimmakayalu MA, Jalali GR, Hacker AM, Vorstman J, Conforto Duffy D, et al. A palindrome-driven complex rearrangement of 22q11.2 and 8q24.1 elucidated using novel technologies. *Genome Res* 2007;17:470–81.
- [38] Chen W, Ullmann R, Langnick C, Menzel C, Wotschovsky Z, Hu H, et al. Breakpoint analysis of balanced chromosome rearrangements by next-generation paired-end sequencing. *Eur J Hum Genet* 2010;18:539–43.

Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukemií

Jančušková T¹, Plachý R¹, Štika J¹, Krutílková L¹, Hardekopf DW¹, Liehr T², Kosyakova N², Čmejla R¹, Žejšková L¹, Kozák T³, Žák P⁴, Karas M⁵, Peková S¹

¹Chambon s.r.o., Laboratoř molekulární diagnostiky, Praha, ²Friedrich-Schiller-Universität, Institut für Human Genetik, Jena, ³FN Královské Vinohrady, Interní hematologická klinika, Praha, ⁴FN Hradec Králové, 2. interní klinika – oddělení klinické hematologie, Hradec Králové, ⁵FN Plzeň, Hematologicko-onkologické oddělení, Plzeň

Transfuzie Hematol. dnes, 19, 2013, No. 1, p. 8–21

SOUHRN

Akutní leukemie (AL) představují heterogenní skupinu maligních onemocnění krvetvorby s různou prognózou. Díky této různorodosti AL nelze s jistotou predikovat odpověď pacienta na léčbu. Proto je velmi důležité sledovat množství zbytkové maligní populace buněk po léčbě, tzv. minimální reziduální nemoc (MRN). K detekci MRN se běžně využívají rekurentní cytogenetické abnormality a mutace v hematologicky významných genech, které jsou rutinním screenin- gem identifikovány u naprosté většiny dospělých pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií a přibližně u poloviny dospělých pacientů s akutní myeloidní leukemií. Z tohoto důvodu je velmi žádoucí identifikovat nové specifické markery leukemických blastů, které budou sloužit ke sledování MRN u pacientů, u nichž nebyla nalezena žádná ze standardně vyšetřovaných aberací.

Naším cílem bylo vyvinout zcela nový technický přístup k identifikaci a mapování unikátních klonálně specifických chromozomových abnormalit až na úroveň jednotlivých nukleotidů, a to pomocí moderních technik molekulární cyto- genetiky, zejména mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace, mnohobarevného pruhování chromozomů (mFISH, mBAND) a multiplexní hybridizace fluorescenčně značených sond (BAC-FISH). Pro vyšší rozlišení byly fluorescenčně značené sondy aplikovány na linearizovaná vlákna DNA (molecular combing, fiber-FISH). Dalším nástrojem, který byl využit k přesné identifikaci zlomových míst aberovaných chromozomů byla mikrodisekce derivovaných chromozomů a následné sekvenování disekovaného materiálu pomocí technologie sekvenování nové generace (NGS). Posledním krokem byla konstrukce specifické molekulární PCR eseje v reálném čase pro monitorování MRN, která umožňuje sledovat odpověď pacienta na léčbu, příp. včas zachytit počínající molekulární relaps onemocnění.

Moderní technologie umožňují detekovat a identifikovat unikátní klonálně specifické abnormality u pacientů s AL. Předložená práce jasně ukazuje, že mapování chromozomových aberací až na úroveň nukleotidů je pro vybrané pacienty s AL realizovatelné a vhodné pro standardní klinickou praxi. Jedná se o laboratorní přístup „šitý na míru“ nemocných s AL, který naplňuje naši představu o personalizované medicíně.

KLÍČOVÁ SLOVA

akutní leukemie, minimální reziduální nemoc, molekulární cytogenetika, chromozomová mikrodisekce, sekvenování nové generace, personalizovaná medicína

SUMMARY

Jančušková T, Plachý R, Štika J, Krutílková L, Hardekopf DW, Liehr T, Kosyakova N, Čmejla R, Žejšková L, Kozák T, Žák P, Karas M, Peková S

Identification of new molecular markers for minimal residual disease assessment in acute leukemia patients

Acute leukaemia (AL) comprises a heterogeneous group of haematological malignancies with varying prognoses. In light of this heterogeneity, individual patient response to treatment can be difficult to predict. Sensitive monitoring of residual leukemic cell populations (minimal residual disease – MRD) is thus very important and holds great potential for improving

treatment strategies. Commonly used MRD targets include recurrent cytogenetic abnormalities and mutations in important haematological genes. Unfortunately, such targets are identified in a majority of adult ALL patients but only in about 50% of adult AML patients. Identification of new specific leukemic blast molecular markers for MRD assessment is therefore highly desirable. Our goal was to develop a unique technical approach for the identification and mapping of clone-specific chromosomal abnormalities down to the single nucleotide level using current molecular cytogenetic techniques, particularly multicolour fluorescence *in situ* hybridization, multicolour chromosome banding (mFISH, mBAND) and multiplex hybridization of fluorescently labelled BAC clones (BAC-FISH). Higher resolution was achieved by hybridization of fluorescent probes to combed DNA fibres (molecular combing, fibre-FISH). Another approach used for the precise identification of chromosomal breakpoints was chromosome micro dissection followed by next-generation sequencing (NGS) of the dissected material. Finally, a specific Real-Time PCR assay to monitor MRD was designed. Modern technologies open new vistas for the detection and identification of unique clone-specific abnormalities in AL patients. Our work clearly suggests that mapping from the chromosomal level down to the nucleotide level is feasible and readily applicable in eligible AL patients, allowing its use in standard clinical practice and as a tool for personalized „tailor-made“ medicine.

KEY WORDS

acute leukaemia, minimal residual disease, cytogenetics, molecular cytogenetics, chromosome microdissection, next-generation sequencing, personalized medicine

ÚVOD

Akutní leukemie (AL) patří mezi závažná hematologická onemocnění s různou prognózou, která závisí na včasné a správné diagnóze. Díky velké biologické diverzitě AL bohužel nelze zcela predikovat odpověď pacienta na léčbu. Proto je nutné využívat laboratorních technik, které pomocí klonálně specifických znaků umožní správně diagnostikovat a stratifikovat pacienty s AL.

Cytogenetická analýza buněk kostní dřeně, případně periferní krve, je nedílnou součástí vyšetření při zachytu onemocnění. Umožňuje nejen upřesnění diagnózy, určení stadia nemoci, ale je také důležitým nezávislým prognostickým ukazatelem. Abnormality karyotypu u *de novo* zjištěných akutních leukemií jsou sice prokazatelné přibližně u 50 % dospělých pacientů s AML, resp. u 70 % dospělých pacientů s ALL (1), ale jen některé z nich mají za následek vznik fúzního produktu, jenž je možné detekovat na molekulární úrovni, a tedy s vyšší citlivostí než je tomu u cytogenetického vyšetření, případně vyšetření pomocí průtokové cytometrie (2). K rutině vyšetřovaným fúzním transkriptům, které lze monitorovat na RNA úrovni patří u pacientů s akutní myeloidní leukemií (AML) zejména AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1), PML-RARA, DEK-CAN (DEK-NUP214), CBF β -MYH11 (3). U pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií (ALL) jsou to fúzní transkripty BCR-ABL, MLL-AF4 (MLL-AFF1), E2A-PBX1 (TCF3-PBX1), TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) (4, 5). U některých pacientů jsou pomocí metod molekulární biologie identifikovány nejrozličnější mutace v hematologicky

významných genech – NPM1, CEBP α , FLT3, c-KIT, WT1 (6, 7, 8). U pacientů s ALL jsou časté přestavby těžkých řetězců imunoglobulinu (IGH) a T-buněčného receptoru (TCR) (9).

Zmíněné chromozomové abnormality, genové mutace a přestavby mohou být v průběhu léčby pacientů s AL použity jako molekulární markery k monitorování minimální reziduální nemoci (MRN). Detekce MRN je v současné době rozhodujícím nástrojem ke zhodnocení kvality odpovědi pacienta na léčbu, jelikož umožňuje predikovat její selhání, případně u pacientů po transplantaci kostní dřeně dovoluje včas předpovědět blížící se relaps onemocnění. Molekulární technologie, založené na PCR v reálném čase (Real-Time PCR), využívající specifických genetických znaků maligních buněk, mají vysokou senzitivitu i specifitu, a jsou proto v moderní medicíně považovány za zlatý standard v diagnostice AL a sledování MRN. Proto je velmi žádoucí identifikovat nové klonálně specifické znaky leukemických buněk, a umožnit tak monitorování MRN i pacientům, u nichž nebyla nalezena žádná ze standardně vyšetřovaných aberací.

Cílem naší současné práce bylo vyvinout postup, který slouží nejen k identifikaci nových unikátních klonálně specifických markerů, ale také k jejich převedení z cytogenetické úrovně (chromozomové) na molekulární úroveň (nukleotidovou). Finálním krokem je příprava PCR esaje v reálném čase pro specifické sledování MRN, která umožní s vysokou specifiitou a citlivostí sledovat dynamiku maligní populace buněk v odpovědi na léčbu pacienta.

MATERIÁL A METODIKA

Pilotní studie

V rámci pilotní studie byly testovány dva přístupy identifikace nukleotidové sekvence zlomu derivovaných chromozomů. Pro oba přístupy byla nutná identifikace derivovaného chromozomu pomocí molekulárně

cytogenetických metod. První způsob spočíval v mapování aberovaného chromozomu pomocí fluorescenčně značených BAC (umělý bakteriální chromozom) sond. Druhým přístupem byla mikrodisekce chromozomů s následnou sekvenací disekovaného materiálu. Pro tyto experimenty byla použita buněčná linie K562 (ATCC, USA) nesoucí derivovaný chromozom 10 a buňky kostní dřeně pacientů s AL.

Tab. 1. AcutePlexX. Seznam rekurentních chromozomových abnormalit detekovaných u pacientů s AL.

Zkumavka	Chromozomová aberace	Fúzní partneři	Zkumavka	Chromozomová aberace	Fúzní partneři
1	t(15;17)	PML/RAR α (bcr 1,2,3)	6	t(4;11)	MLL/AF4
	t(8;21)	AML1/ETO		t(9;11)	MLL/AF9
2	t(9;22)	BCR/ABL		t(11;19)	MLL/ENL
	t(3;21)	AML1/MECOM (EVII/MDS1) AML1/EAP		t(6;11)	MLL/AF6
	t(16;21)	AML1/MTG16		t(1;11)	MLL/EPS15
	t(3;5)	MLF1/NPM1		t(11;19)	MLL/ELL
3	t(10;11)	NUP98/HHEX	7	t(10;11)	MLL/AF10
	t(7;11)	NUP98/HOXA9		t(X;11)	MLL/SEPT6
	inv(11)	NUP98/DDX10		t(11;17)	MLL/AF17
	t(11;20)	NUP98/TOPI		t(1;11)	MLL/AF1q
	t(5;11)	NUP98/NSD1		t(11;17)	MLL/SEPT9
	t(1;11)	NUP98/PMX1		t(X;11)	MLL/AFX
	t(2;11)	NUP98/HOXD13		t(11;19)	MLL/EEN
	t(3;11)	NUP98/TOP2B		t(11;19)	MLL/MYO1F
	t(11;18)	NUP98/SETBP1		t(10;11)	MLL/TET1
	t(11;12)	NUP98/HOXC11		t(11;22)	MLL/p300
	t(8;11)	NUP98/NSD3		t(11;16)	MLL/CBP
	t(2;11)	NUP98/HOXD11	8	dup(11)	MLL-PTD
	t(11;12)	NUP98/RARG		t(8;22)	MOZ/EP300
	t(X;11)	NUP98/HMGB3		inv(8)	MOZ/TIF2
	t(11;17)	NUP98/PHF23		t(8;16)	MOZ/CBP
	inv(11)	NUP98/MLL		t(16;21)	TLS(FUS)/ERG
	t(3;11)	NUP98/LNP1	9	t(1;22)	OTT/MAL
	t(9;11)	NUP98/PMX2		t(3;3), inv(3)	RPN1/EV11
4	inv(16)	CBFb/MYH11 (typ A - K)		t(5;12)	ETV6/PDGFRB
5	t(6;9)	DEK/CAN		t(12;22)	ETV6/MN1
	t(11;17)	NUMA1/RAR α		t(3;12)	ETV6/MECOM
	der(17)	PRKAR1A/RAR α		t(12;13)	ETV6/CDX2
	t(X;17)	BCOR/RAR α		t(12;21)	ETV6/AML1
	t(4;17)	FIP1L1/RAR α		t(12;15)	ETV6/NTRK3
	t(5;17)	NPM1/RAR α		t(1;12)	ETV6/ARG
	der(17)	STAT5B/RAR α	10 (ALL)	t(1;19)	E2A/PBX1
	t(11;17)	PLZF/RAR α		del(1)	SIL/TAL1

Pacienti

V této práci byly analyzovány vzorky kostní dřeně dvou pacientů se stanovenou diagnózou AL. Kostní dřeň byla odebírána v záchytném onemocnění a dále v průběhu léčby pacienta. Vzorky byly odebírány na základě informovaného souhlasu pacienta.

Izolace DNA a RNA a reverzní transkripce

DNA i RNA byla izolována z mononukleární frakce kostní dřeně pacientů s AL v záchytném onemocnění a v jednotlivých bodech sledování MRN. DNA byla izolována pomocí automatického izolátoru MagNA Pure (Roche, Německo); RNA byla izolována pomocí TRI Reagent (Sigma, Německo), podle návodu uvedeného výrobcem. Reverzní transkripce byla provedena systémem VersoRT Blend (AB-gene, UK), podle návodu doporučeného výrobcem.

PCR v reálném čase

Pro screening chromozomových aberací u pacientů s nově diagnostikovanou AL byl využit multiplexní Real-Time PCR systém AcutePlexX, vyvinutý naší laboratoří (10), který umožňuje detekovat více než 100 známých fúzních transkriptů a jejich sestřihových variant v 10 paralelních PCR reakcích (tab. 1). Vlastní analýza probíhá na platformě Rotor-Gene Q (Qiagen, Německo).

Kultivace a zpracování vzorků kostní dřeně

Vzorky kostní dřeně byly separovány na hustotním gradientu Histopaque (Sigma, Německo). 10M buněk odebraných z mononukleární frakce kostní dřeně bylo kultivováno v kultivačním médiu RPMI 1640 (PAA Laboratories, Rakousko) za přítomnosti 10% fetálního séra (PAA Laboratories, Rakousko), antibiotik (Penicilin/Streptomycin) a L-glutaminu (PAA Laboratories, Rakousko) při 37 °C/5% CO₂ po dobu 24 hodin. Vzorek byl dále zpracován dle standardních cytogenetických postupů – přidání kolcemidu (0,1 µg/ml) (Gibco, UK), hypotonie a fixace směsí metanol/kyselina octová.

Buněčná linie K562 byla kultivována v RPMI 1640, s přísadkou 10% fetálního séra, antibiotik (Penicilin/Streptomycin) a glutaminu pro dosažení exponenciálního růstu, a poté zpracována analogicky jako vzorky kostní dřeně pacientů s AL.

Molekulární cytogenetika

Vyšetření karyotypu pacientů s AL, resp. buněčné linie K562, a upřesnění zlomů na derivovaných chromo-

zomech bylo provedeno pomocí technik mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace – mFISH a mnohobarevného pruhození chromozomů – mBAND (MetaSystems, Německo). Veškeré hybridizační a post-hybridizační kroky se řídily dle doporučeného manuálu výrobce. Analýza probíhala s použitím fluorescenčního mikroskopu Axio Imager.Z2 (Zeiss, Německo) a počítačového softwaru Isis (verze 5.4, MetaSystems, Německo). U každého pacienta a buněčné linie bylo analyzováno 20 metafází.

Knihovna BAC

K experimentům byla využita genomická BAC knihovna (GenomicSet 737, ImaGenes, Německo), obsahující cca 25 000 viabilních bakteriálních klonů nesoucích unikátní dlouhé inzerty lidské DNA (~150 kb) klonované ve vektoru BAC (pBACe3.6, pBeloBAC11, pCYPAC2). Knihovna je vlastnictvím naší laboratoře a je po domluvě přístupná pro spolupracující laboratoře.

Izolace DNA z BAC klonů

DNA z klonů BAC byla izolována z 50 ml bakteriální kultury kultivované přes noc v LB (Luria-Bertani) médiu (Sigma, Německo) s přidáním 30 µg/ml chloramfenikolu, příp. kanamycinu (finální koncentrace – 1,5 mg/50 ml LB) pomocí kitu PhasePrep™ BAC DNA (Sigma, Německo) dle modifikovaného protokolu od výrobce, který byl doplněn o extrakci BAC DNA pomocí směsi fenol/chloroform.

Značení BAC DNA

K fluorescenčnímu značení DNA izolované z BAC klonu byla použita metoda „nick-translace“ za použití komerčně dostupného kitu – Nick Translation System (Invitrogen, UK) a komerčních fluorescenčně značených nukleotidů (Jena Bioscience, Německo). Pro značení BAC DNA byly použity nukleotidy s fluorofory TexasRed-dUTP, Fluorescein-dUTP, Atto425-dUTP, Cy5-dUTP a Cy3-dUTP. Fluorescenční značení probíhalo v 50 µl reakčním objemu dle standardního protokolu doporučeného výrobcem. Koncentrace a čistota DNA byla stanovena spektrofotometricky. Do značící reakce byl vložen 1 µg BAC DNA.

Fluorescenčně značená DNA byla poté standardně precipitována přidáním 1/10 objemu 3M octanu sodného (Sigma, Německo) a 2,5x objemu 96% etanolu. K precipitátu byl přidán 1 µg Cot-1 DNA (BlueGnome, UK) k vyvázání repetitivních sekvencí. Po sražení byl DNA precipitát rozpuštěn v 5 µl Hi-Di formamidu (Applied

Biosystems, USA) a uchováván při 4 °C. Pro následnou hybridizaci byl smíchán 1 µl DNA/Hi-Di roztoku s 9 µl hybridizačního pufru (50% formamid, 10% dextran sulfát, 10 mM Tris-HCl, 0,1% Tween20, 2xSSC).

Hybridizace BAC sond

Denaturace sondy a preparátu probíhala zvlášť. Preparát byl denaturován pomocí denaturačního pufru (70% formamid, 2xSSC, H₂O) po dobu 2 minut při teplotě 75 °C na vyhřívané ploténce. Poté byl preparát odvodněn etanolovou řadou (70 %, 85 %, 96 %). Sonda byla denaturována 5 minut při teplotě 75 °C v termocycleru (Bio-Rad, USA). Hybridizace probíhala za standardních podmínek při 37 °C v hybridizační komůrce (Boeckel Scientific, USA).

Izolace celogenomové DNA

K izolaci celogenomové DNA, pro účely „long-range“ PCR, byl použit automatický izolátor nukleových kyselin MagNA Pure Compact System (Roche, Německo). Vstupním materiálem byla buněčná suspenze.

„Long-range“ PCR (LR-PCR)

Primery pro LR-PCR reakci byly navrženy pomocí počítačového programu Vector NTI (Invitrogen, verze 11.5). K amplifikaci LR-PCR produktů byl použit kit Expand Long Range, dNTPack (Roche, Německo). Postup při PCR reakci se řídil doporučeními výrobce. Reakční směs (celkový objem 50 µl) obsahovala přibližně 200 ng DNA, 5U Expand Long Range Enzyme Mix, DMSO ve finální koncentraci 5 %, 1x Expand Long Range Buffer s MgCl₂, směs nukleotidů ve finální koncentraci 500 µM a 0,4 µM každého z navržených primerů. Po úvodní inkubaci (8 min., 92 °C) následovalo 35 cyklů amplifikace (denaturace 30s/92 °C, hybridizace primerů 30s/58 °C a elongace 6 min./68 °C), pro kontrolu úspěšnosti PCR reakce bylo 10 µl PCR produktu separováno na 0,7% agarozovém gelu. Zbýlý objem PCR reakce (40 µl) byl purifikován pomocí Gel Extraction Kitu (Qiagen, Německo) a eluován do 30 µl finálního objemu. LR-PCR amplikony byly fluorescenčně značeny „nick-translací“ analogickým postupem jako BAC DNA (viz Značení BAC DNA). LR-PCR sondy byly hybridizovány na metafázní chromozomy společně s kontrolní centromerickou sondou pro konkrétní chromozom (MetaSystems, Německo).

Izolace DNA pro „fiber-FISH“

DNA byla izolována z kultivovaných buněk, které byly promyty roztokem PBS a lyzovány lyzačním pufrem

- Tris-EDTA, Sarkosyl (Sigma, Německo) a Proteinasa K (Roche, Německo), lyzát byl ošetřen RNázou (Sigma, Německo) a extrahován směsí fenol/chloroform. DNA byla precipitována pomocí roztoku 3M octanu sodného (NaAc) (Sigma, Německo) a 96% etanolem. Precipitát byl opláchnut 80% etanolem a rozpuštěn v 0,5xTE pufru.

„DNA combing“ a „fiber-FISH“

DNA „česání“ („DNA combing“) s hybridizací fluorescenčně značených sond a následnou imunodetekcí signálů pomocí monoklonálních protilátek bylo provedeno dle protokolu francouzské laboratoře (Institute of Human Genetics Montpellier, France; osobně z laboratoře, prof. Pasero).

Vlákna DNA byla „česána“ na silanizované krycí sklo (Genomic Vision, Francie) pomocí přístroje, který umožňuje tažení skel konstantní rychlostí 300 µm/s (Dip Coater). Použitý přístroj byl ve spolupráci s naší laboratoří navrhnout a vyroben Elektrotechnickou fakultou Západočeské Univerzity v Plzni. Linearizovaná vlákna DNA byla vizualizována cyaninovým barvivem YOYO-1 (Invitrogen, UK).

Imunodetekce

LR-PCR produkty značené fluorofory TexasRed-dUTP a Fluorescein-dUTP byly denaturovány 5 minut při 75 °C. „Načesaná“ skla byla dehydratována ve vzestupné etanolové řadě (70 %, 85 %, 96 %) a denaturovaná v čerstvě připraveném 1M roztoku hydroxidu sodného s následnou neutralizací pufrem PBS. Hybridizace probíhala při 37 °C přes noc. Nespecificky navázaná sonda byla odstraněna odmytím při 44 °C v 50% formamidu a 2 x SSC. Preparáty byly následně vloženy do roztoků 2 x SSC, PBS a ošetřeny 1% roztokem BSA (Albumin z bovinního séra, Sigma). Pro vizualizaci vláken a sond jsme využili možnosti kombinace různě značených protilátek (IgG), které nám umožnily detekci tří barev a amplifikaci signálů. Proti jednovláknové DNA (ssDNA) jsme použili myší protilátky proti ssDNA (Millipore, USA), které sloužily jako antigen pro protilátku králíčí značené Alexa Fluor 350 (Invitrogen, UK). Signály hybridizovaných sond byly zesíleny dvěma vrstvami protilátek, proti TexasRed (králíčí)/Fluorescein (kozy), a vrstvou fluorescenčně značených protilátek proti králíčímu IgG (oslí, Alexa Fluor 594)/kozy IgG (kuřecí, Alexa Fluor 488) (Invitrogen, UK). Mezi jednotlivými vrstvami byly preparáty promyty v PBS/T (0,1% Triton X 100 solution, Sigma, Německo). Pořízení obrázků a analýza dat byla provedena pomocí fluorescenčního mikroskopu Axio Imager.Z2 (Zeiss, Německo).

Chromozomová mikrodisekce

Mikrodisekce derivovaných chromozomů probíhala ve spolupráci s Institut für Human Genetik, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Německo. Buněčné suspenze byly kapány na krycí skla (24 x 60 mm) ošetřená 10% roztokem SDS. Čerstvě nakapaná skla byla inkubována ve fosfátovém pufru (pH 6,88) po dobu 1 min, a poté trypsinizována (40–60 s). Skla byla barvena roztokem Giemsa po dobu 2–3 min a opláchnuta destilovanou vodou.

Vlastní mikrodisekce byla provedena pomocí skleněné jehly (průměr ~500 nm) pod invertovaným mikroskopem (Axiovert-135, Axiovert-10 Zeiss, Německo) vybaveným elektronickým mikromanipulátorem. Po mikrodisekci byly fragmenty chromozomů ošetřeny roztokem proteinázy K (11).

PCR s degenerovanými primery

K amplifikaci disekovaných produktů byla použita metoda PCR s degenerovanými primery (DOP-PCR) s použitím komerčně dostupného WGA - Whole Genome Amplification - kitu (Sigma, Německo), dle návodu doporučeného výrobcem. Specifita disekovaných chromozomových fragmentů byla ověřena reverzní fluorescenční *in situ* hybridizací na metafázní chromozomy (12).

Sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing; NGS)

K sekvenaci byl využit GS Junior pyrosekvenační systém (Roche, Německo). V průběhu celého procesu přípravy DNA knihovny, klonální amplifikace i vlastního sekvenování bylo postupováno dle návodu výrobce, pouze s drobnou změnou – před opravou konců fragmentů bylo 500 ng produktů DOP-PCR nejprve přečištěno pomocí Gel Extraction Kitu (Qiagen, Německo) a následně pomocí MinElute PCR Purification Kitu (Qiagen, Německo). Pro klonální amplifikaci fragmentů sloužil GS Junior Titanium emPCR Lib-L Kit (Roche, Německo).

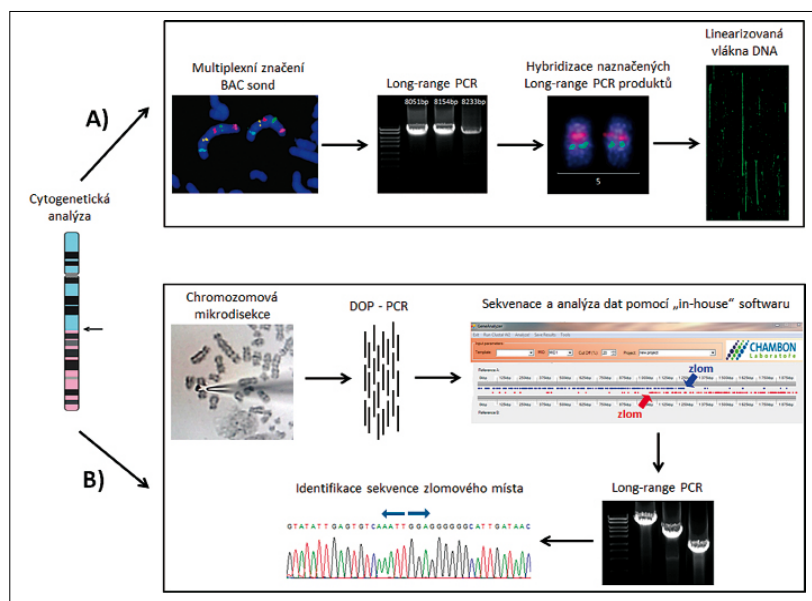
GeneAnalyzer software

Pro identifikaci zlomových míst na derivovaných chromozomech byl

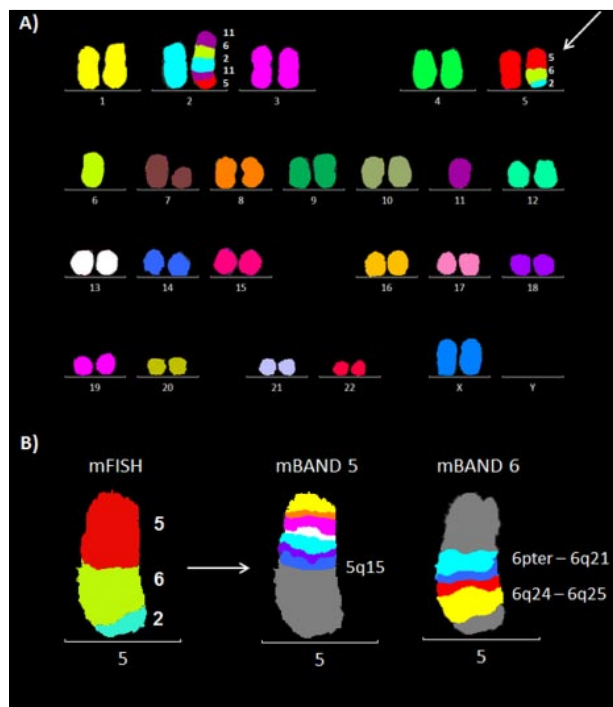
naší laboratoří vyvinut software GeneAnalyzer, který umožňuje jednotlivá čtení (reads) mapovat na referenční sekvenční chromozomů (NCBI sestava 37.3). Jako hlavní algoritmus pro určení homologie software využívá BLAST+ verze 2.2.26. Hlavním úkolem řídicí aplikace je shromažďovat získané informace o homologii a pozici jednotlivých mapovaných čtení na referenční sekvenci. Software umožňuje nastavit celou řadu parametrů důležitých pro srovnání čtení s referencí (např. procento homologie, minimální délku pro pozitivní přiřazení, minimální diferencí v homologii) tak, aby využitelnost získaných čtení z přístroje GS Junior byla maximální, ale při tom, aby nedocházelo k falešně pozitivním přiřazením.

VÝSLEDKY

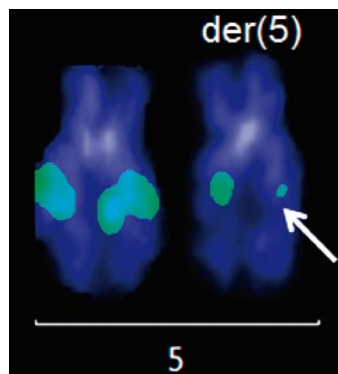
K vyřešení uvedených cílů byla klíčová identifikace derivovaných chromozomů v karyotypu pacientů a buněčné linie K562 pomocí technik molekulární cytogenetiky – mFISH a mBAND. K přesné identifikaci chromozomových zlomů byly navrženy dva různé přístupy. Prvním přístupem bylo mapování zlomů na derivovaném chromozomu pomocí hybridizace fluorescenčně značených BAC klonů. Pro tento experiment jsme použili chromozomové preparáty vzorku kostní dřeně pacienta s AML (pacient 1). Druhý přístup spo-



Obr. 1. Znárodnění dvou způsobů identifikace nového markeru pro sledování MRN. A) Mapování derivovaného chromozomu pomocí fluorescenčně značených BAC klonů a LR-PCR produktů. B) Mikrodisekce derivovaného chromozomu následovaná amplifikací a sekvenací disekovaného materiálu.



Obr. 2. Molekulárně cytogenetická analýza karyotypu pacienta 1. A) Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (mFISH). B) Mnohobarevné pruhování s vysokou rozlišovací schopností (mBAND) pro chromozomy 5 a 6.

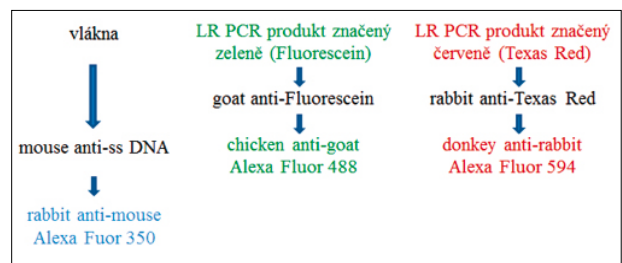


Obr. 3. Analýza pomocí fluorescenčně značených BAC klonů. Hybridizace BAC klonu RP11-461G12 pro chromozom 5q15. Šipka označuje signál o nápadně slabší intenzitě.

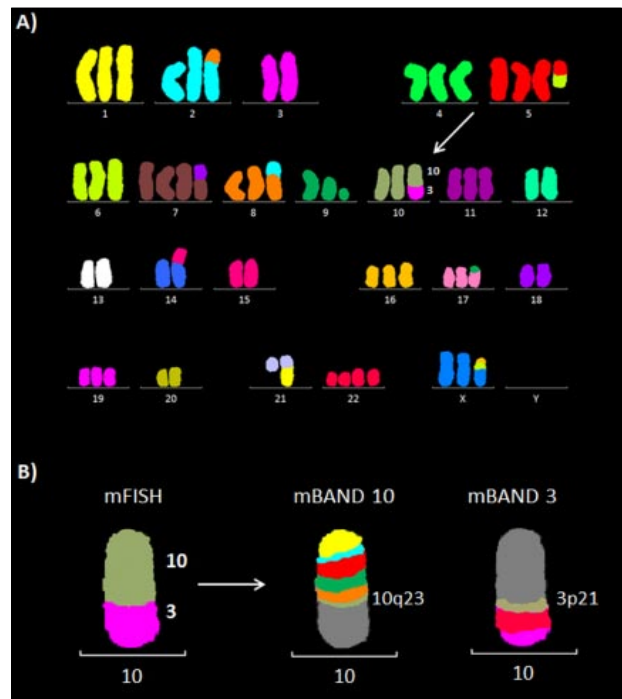
detekce MRN jsme dále analyzovali derivovaný chromozom 5 (obr. 2 A, B). Strategii pozičního klonování jsme dále mapovali zlomové oblasti na der(5) pomocí fluorescenčně značených BAC sond. Při poslední

čítal v mikrodisekci části derivovaného chromozomu a následně sekvenaci disekovaného materiálu. Pro mikrodisekci byla zvolena buněčná linie K562 a buňky kostní dřeně pacienta s ALL (pacient 2). Hlavní kroky obou strategií jsou znázorněny na obrázku 1.

Molekulárně cytogenetickým vyšetřením (mFISH a mBAND) jsme u pacienta 1 našli karyotyp s komplexními změnami a pro účely

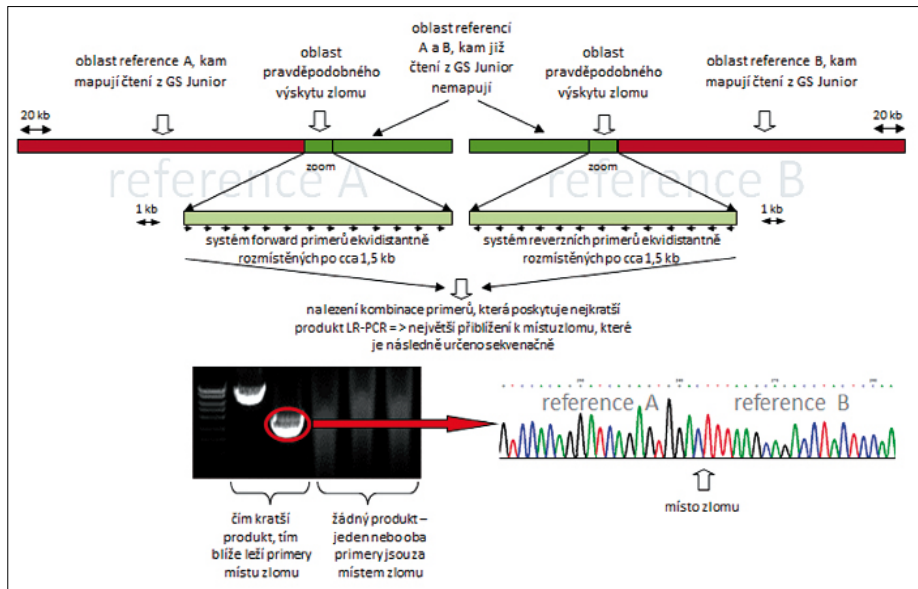


Obr. 4. Schéma trojbarevné detekce pomocí značených protilátek.



Obr. 5. Molekulárně cytogenetická analýza buněčné linie K562. A) Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (mFISH). B) Mnohobarevné pruhování s vysokou rozlišovací schopností (mBAND) pro chromozomy 10 a 3.

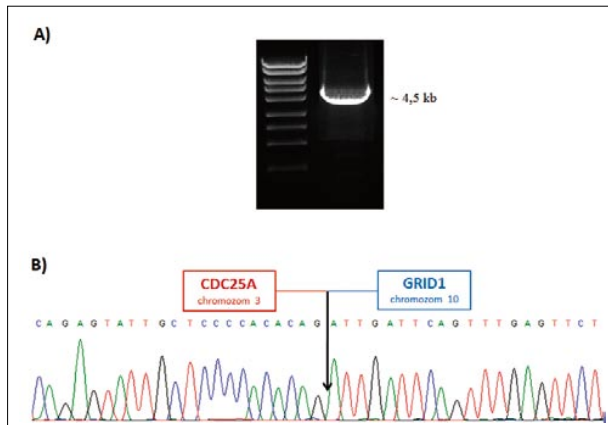
hybridizaci jsme identifikovali BAC klon RP11-461G12 ležící pravděpodobně v místě zlomu chromozomu 5. Tento BAC měl nápadně nižší intenzitu signálu ve srovnání se zdravým chromozomem 5 (obr. 3). Pro upřesnění polohy zlomu jsme sekvenci BAC klonu RP11-461G12 použili k návrhu primerů pro LR-PCR reakci. Amplifikovaný materiál byl dále použit na přípravu vlastních fluorescenčně značených LR-PCR sond. Průměrná délka produktů, které jsme pomocí LR-PCR amplifikovali, byla ~8 kb (6285 bp – 9088 bp). Protože citlivost metody FISH na metafázních chromozomech neumožňuje detekovat sondy o velikosti



Obr. 6. Schématické zobrazení postupu při identifikaci zlomového místa na derivovaném chromozomu.

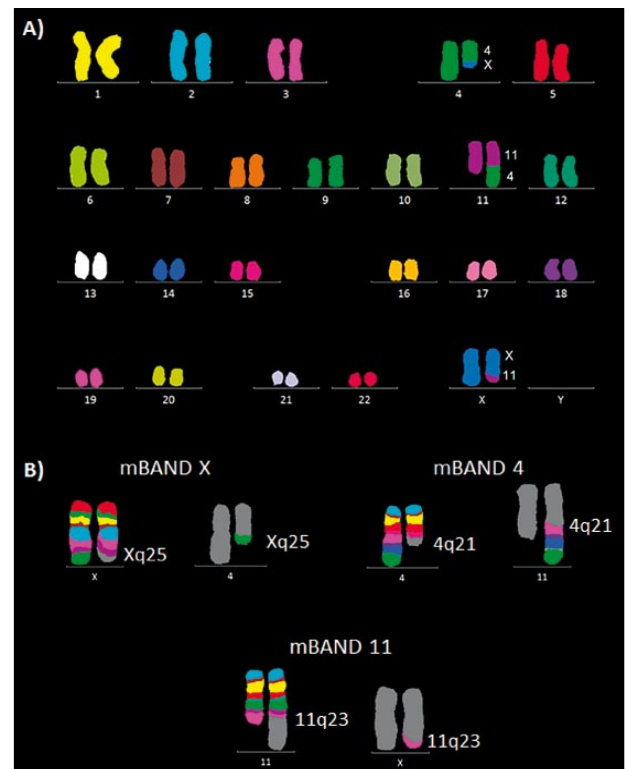
amplifikovaných produktů (tj. ~8 kb), byly vždy 3 až 4 LR-PCR amplikony spojeny, a sonda tudíž pokrývala oblast ~25 kb. Signály LR-PCR sond na metafázních chromozomech byly obtížně reprodukovatelné, proto jsme k hybridizaci LR-PCR sond použili linearizovaná vlákna DNA (obr. 4).

Metodami mFISH a mBAND jsme u buněčné linie K562 identifikovali hypotriploidní karyotyp s přítomností derivovaného chromozomu - der(10)t(3;10)(p21.3;q23) (obr. 5). Část derivovaného chromozomu 10 obsahující materiál z chromozomů 3 a 10 byla disekována pomocí skleněné jehly. Pro získání dostatečného



Obr. 7. Buněčná linie K562. A) LR-PCR produkt. B) Nukleotidová sekvence zlomu derivovaného chromozomu 10.

množství DNA byly disekované fragmenty amplifikovány, a poté sekvenovány (obr. 1 B). Celkem bylo pro der(10) získáno 80 789 čtení, která byla přiřazena k referenčním sekvencím z chromozomů 3 a 10 a analyzována pomocí softwaru GeneAnalyzer, vyvinutého laboratoří Chambon (Plachý R., nepublikováno) (tab. 2). Z takto zmapované sekvenční byly vždy po 1000 bp navrženy sady primerů (obr. 6) pro LR-PCR, která vedla k získání produktu (~4,5 kb) (obr. 7 A). Tento amplikon byl poté sekvenován z obou stran standardní Sangerovou



Obr. 8. Molekulárně cytogenetická analýza karyotypu pacienta 2. A) Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (mFISH). B) Mnohobarevné pruhování s vysokou rozlišovací schopností (mBAND) pro chromozomy X, 4 a 11.

Tab. 2. Základní informace o analýze jednotlivých zlomových míst.

Zdroj	Chromozom	Počet čtení	Využitelnost čtení (%)	Medián délky čtení (bp)
linie K562	der(10)	80 789	67,2	279
pacient 2	der(4)	122 279	59,6	390
	der(11)	120 209	63,5	325

metodou. Sekvenační analýza potvrdila přítomnost sekvencí z chromozomů 3 a 10 a identifikovala oba fúzní partnery, gen CDC25A na chromozomu 3 (místo zlomu v intronu 2) a GRID1 na chromozomu 10 (místo zlomu v intronu 4) (obr. 7 B).

U pacienta 2 byla nalezena balancovaná chromozomová translokace zahrnující gen MLL – 46,XX,t(X;4;11)(q25;q21;q23) (obr. 8). Fúze genů MLL-AF4 byla potvrzena i pomocí Real-Time PCR (AcutePlexX) a sekvenační analýzou (neuveďeno). Stejný postup jako u buněčné linie byl aplikován i na derivované chromozomy 4 a 11 pacienta 2. Z každého derivovaného chromozomu bylo disekováno 10 fragmentů. Jejich specifita byla ověřena hybridizací na metafázni chromozomy negativní kontroly (obr. 9 A, B). Sekvenací disekovaných chromozomových fragmentů bylo získáno 122 279, resp. 120 209 čtení pro chromozomy der(4), resp. der(11) (tab. 2). LR-PCR amplifikace vedla k získání produktů o velikostech ~ 0,5 kb pro derivovaný chromozom 4, resp. ~ 3 kb pro derivovaný chromozom 11 (obr. 10). Sekvenováním těchto produktů jsme identifikovali

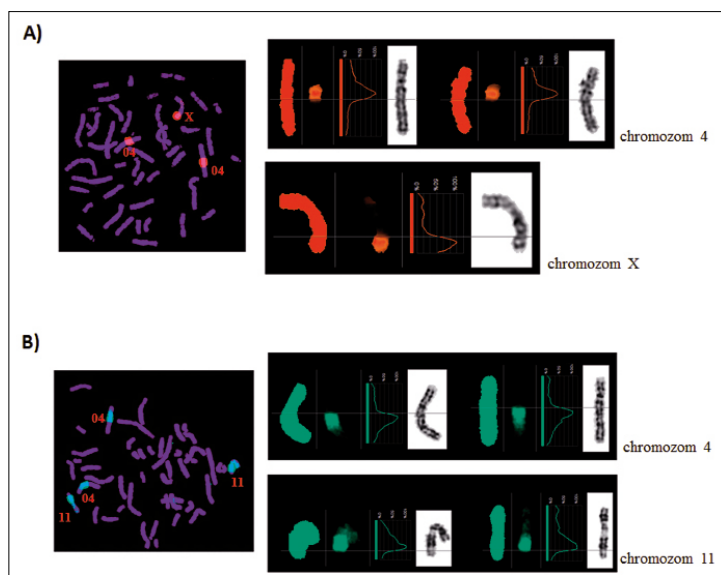
DNA sekvence chromozomových zlomů a fúzní partnery. Derivovaný chromozom 4 vznikl fúzí pseudogenu LOC392539 z chromozomu X a genu AF4 na 4q21. Derivovaný chromozom 11 vznikl fúzí genů MLL (intron 9) a AF4 (intron 5) (obr. 11). Návrh MRN eseje pro kvantitativní PCR v reálném čase poté umožnil kvantifikaci nově identifikovaných cílů (zlomy derivovaných chromozomů 4 a 11 – zlomová místa Xq25; 4q21, resp. 4q21; 11q23) a také srovnání s již zavedeným cílem pro sledování MRN (fúzní transkript MLL-AF4) (obr. 12).

Příklad mapování zlomového místa (derivovaný chromozom 4, pacient 2) pomocí aplikace GeneAnalyzer je uveden na obrázku 13.

DISKUSE

Specifické testy k detekci MRN umožňují precizně monitorovat osud maligní populace buněk v těle pacienta v průběhu léčby a vyhodnotit léčebnou odpověď. Proto má sledování MRN v průběhu léčby pacientů s AL nesporný klinický význam. Cílem naší práce bylo pomocí moderních technik molekulární cytogenetiky, celogenomového sekvenování a standardního Sangerova sekvenování připravit flexibilní metodiku pro identifikaci nových klonálně specifických znaků leukemických buněk u pacientů s AL, u kterých nelze pomocí běžného screeningového panelu analýz v záchytu onemocnění nalézt molekulární marker pro sledování MRN. Námi připravená metodologie pro detekci a identifikaci unikátních klonálně specifických aberací následně umožňuje připravit testy pro kvantitativní PCR v reálném čase ke sledování MRN. Tato technika může pro klinického lékaře představovat cenný nástroj pro sledování dynamiky vývoje maligní populace buněk nesoucích konkrétní unikátní klonální znak, a tudíž poskytnout možnost zhodnocení léčebné odpovědi pacienta tam, kde jiné techniky detekce MRN selhávají. V kombinaci s dalšími vyšetřovacími metodami je molekulární informace důležitým kamínkem v mozaice vyšetřovacích možností s potenciální návazností na léčbu.

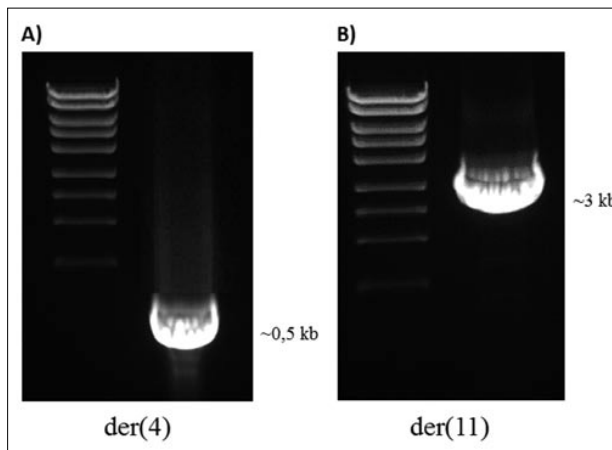
Není bohužel možné tyto unikátní MRN testy mezilaboratorně standardizovat, jelikož se jedná o unikátní abnormality. Pro testování funkčnosti unikátních MRN testů (specifita, dynamický rozsah detekce) jsou aplikována identická pravidla jako pro testování funkčnosti MRN testů založených na rekurentních genetických abnormalitách. Proto lze s vysokou mírou pravděpodobnosti považovat vý-



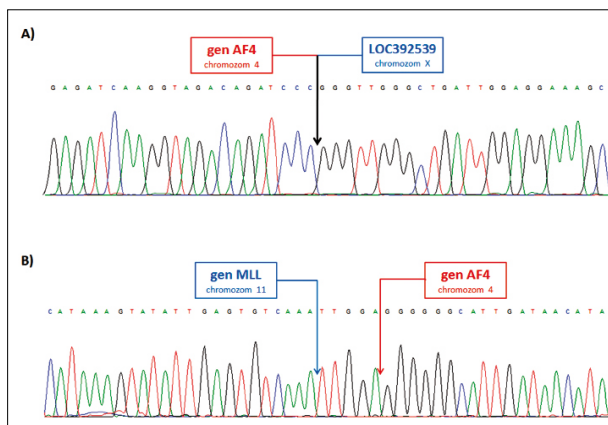
Obr. 9. Reverzní FISH. Ověření specifity disekovaných chromozomových fragmentů u pacienta 2. A) Derivovaný chromozom 4. B) Derivovaný chromozom 11.

sledky i těchto unikátních molekulárních analýz za spolehlivé.

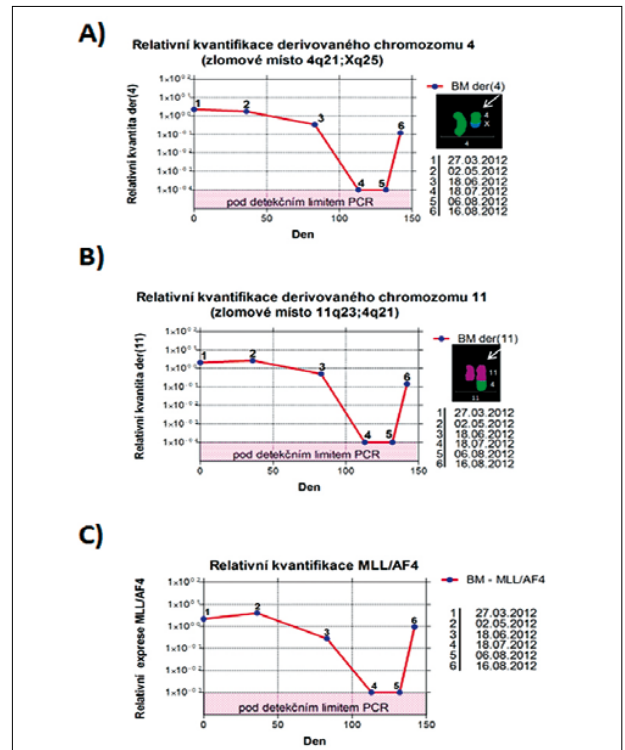
Imunofenotypizační analýza exprese CD antigenů na leukemických blastech je nedílnou součástí diagnostického procesu u pacientů s AL. Vyšetření pomocí průtokové cytometrie je důležité nejen při stanovení diagnózy, ale také k monitorování účinnosti léčby a stanovení prognózy onemocnění. Nicméně, pro účely detekce MRN u pacientů s AL může být využití průtokové cytometrie limitováno nestabilitou imunologických profilů leukemických buněk v průběhu léčby. Senzitivita průtokové cytometrie je 10^{-3} až 10^{-4} , v závislosti na typu leukemie, použitém přístrojovém vybavení a detekčním panelu protilátek (13, 14, 15).



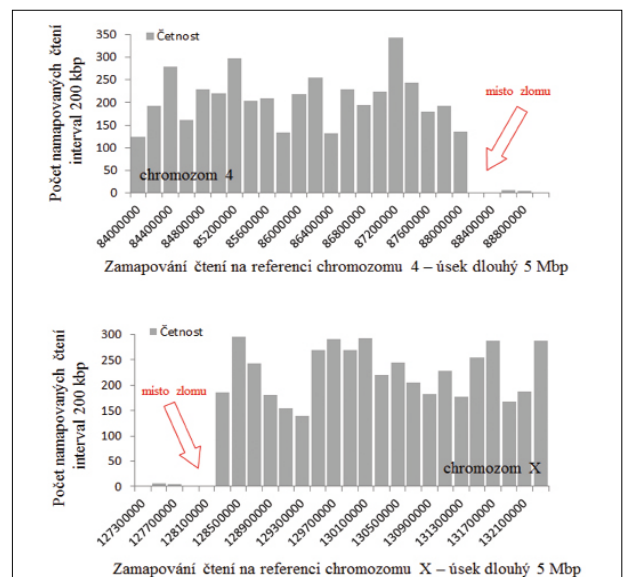
Obr. 10. LR-PCR produkty u pacienta 2. A) Derivovaný chromozom 4. B) Derivovaný chromozom 11.



Obr. 11. Sekvence LR-PCR produktů A) derivovaný chromozom 4; fúze genu AF4 (intron 5) a pseudogenu LOC392539 na chromozomu X. B) derivovaný chromozom 11; fúze genů MLL (intron 9) a AF4 (intron 5).



Obr. 12. Kvantifikační grafy. A) Relativní kvantifikace chromozomového zlomu na der(4). B) Relativní kvantifikace chromozomového zlomu na der(11). C) Relativní kvantifikace fúzního transkriptu MLL-AF4. BM – kostní dřeň.



Obr. 13. Zlom na derivovaném chromozomu 4 určený pomocí softwaru GeneAnalyzer, vyvinutého laboratoří Chambon.

Stanovení MRN pomocí kvantitativní PCR v reálném čase dosahuje obvykle senzitivity 10^{-4} – 10^{-5} (8, 15). Vyšetření pomocí cytogenetických metod je diagnosticky i prognosticky velmi užitečné, ale není dostatečně senzitivní k detekci zbytkových leukemických buněk u pacientů s AL. Základní cytogenetické vyšetření je ovlivněno získáním adekvátního počtu analyzovatelných metafází. Molekulární cytogenetické vyšetření pomocí FISH je sice citlivější, nezávislé na proliferačním potenciálu buněk a umožňuje analyzovat větší počet buněk než je tomu u klasické cytogenetiky, nicméně, pro účely stanovení MRN je nesrovnatelně vhodnější a citlivější metodika PCR. Prognostický význam detekce MRN pomocí PCR byl potvrzen mnoha pracemi (15, 16, 17, 18, 19). V naší laboratoři slouží jako cíl pro monitorování MRN pacientů s akutními leukemiemi klonální přestavby těžkých řetězců imunoglobulinu (IGH) a T-buněčného receptoru (TCR), fúzní transkripty a klonálně specifické mutace prognostických markerů asociovaných s leukemiemi identifikované pomocí konvenční PCR s následným sekvenováním. Fúzní transkripty jsou zahrnuty v unikátním diagnostickém systému AcutePlexX, díky kterému jsme schopni detekovat více než 100 známých fúzních transkriptů a jejich sestřihových variant (tab. 1). Uvedenými přístupy identifikujeme cíl pro sledování MRN přibližně u 50 % dospělých pacientů s AML. Popsaný postup identifikace nových klonálně specifických markerů maligních buněk umožňuje využívat i dosud nepopsané chromozomové aberace jako specifický cíl pro detekci a kvantifikaci MRN na molekulární úrovni.

K dosažení uvedeného cíle byly navrženy dva postupy vycházející ze stanovení karyotypu a identifikace derivovaného chromozomu. Prvním přístupem je mapování zlomových oblastí derivovaného chromozomu pomocí mFISH, mBAND a hybridizace fluorescenčně značených BAC sond. Druhým přístupem je mikrodisekce derivovaného chromozomu spojená s celogenomovým sekvenováním.

Mapování chromozomových zlomů lze považovat za konvenční metodu identifikace genomových abnormalit nejen u leukemických pacientů, ale také u pacientů se solidními tumory a jedinců s balancovanými translokacemi (20, 21, 22). Základním předpokladem je sestavení karyotypu a přesná identifikace derivovaného chromozomu. Klasická karyotypová analýza je limitována rozlišením a morfologií chromozomů. Z uvedených důvodů využíváme k identifikaci karyotypu pacientů kromě klasických „pruhovacích“ technik navíc i techniku molekulární cytogenetiky – mFISH, resp. mBAND, které umožňují přesně a velmi rychle charakterizovat materiál aberovaných chromozomů. Uvedené metody

dosahují rozlišení 2–3 Mb, resp. 1–1,5 Mb, zatímco klasická cytogenetická analýza poskytuje rozlišení 7–10 Mb (23, 24). Nicméně, i po zavedení metod molekulární cytogenetiky do rutinní praxe není úroveň rozlišení dostačující k precizní identifikaci zlomových oblastí derivovaných chromozomů. Proto je velmi cenným nástrojem dostupnost genomických knihoven, např. knihovna BAC klonů, kterou máme k dispozici v naší laboratoři. Knihovna čítá ~ 25 000 klonů a pokrývá celý lidský genom. Máme tedy možnost přípravy kvalitních BAC sond takřka v neomezeném množství. Díky DNA knihovně se můžeme vyhnout limitujícím podmínkám komerčně dodávaných sond, a to nejen časovým – dodání vybraných sond do 14 dnů, ostatních až za jeden měsíc; ale také kvalitativním – komerčně dostupné jen dva fluorofory, kdy v naší laboratoři dokážeme značit až pět různými fluorofory. Díky multiplexnímu značení BAC klonů je možné v jedné hybridizaci použít až pět různých sond, čím se mapování zlomů výrazně urychluje. Pro ověření specifity BAC sond rehybridizujeme chromozomový preparát, na kterém byla aplikována metoda mFISH, příp. mBAND, tudíž není nutné používat kontrolní sondu. Navíc díky společné hybridizaci pěti BAC sond je velmi nepravděpodobné, že by všechny sondy nespecificky hybridizovaly ke stejnému chromozomu. U pacienta 1 byl BAC klon ležící v místě zlomu rozpoznán díky slabšímu signálu na derivovaném chromozomu ve srovnání se zdravým chromozomem (obr. 3), což bylo dále potvrzeno mapováním pomocí techniky NGS (neuváděno). V případě mapování reciproké translokace jsme pozorovali „rozštěpený“ signál na obou translokovaných chromozomech (neuváděno). Protože délka sekvence tohoto BAC (RP11-461G12) neumožňovala konstrukci PCR testu, bylo nutné použít metodik pro ještě vyšší rozlišení. Toho jsme dosáhli pomocí LR-PCR. Získané amplikony jsme fluorescenčně označili a použili jako sondy. Signály na metafázních chromozomech byly jasné a specifické, ale často byly přítomny jen na jednom z homologických chromozomů. To mohlo být způsobeno odlišným stupněm kondenzace obou homologů a také epigenetickými faktory (25, 26, 27). Pro lepší reprodukci signálů sond je proto vhodné aplikovat metodu s vyšším rozlišením, např. metodu „fiber-FISH“, která spočívá v uniformním a rovnoběžném natažení vláken DNA pomocí ustupujícího menisku při konstantní rychlosti 300 $\mu\text{m/s}$, kde přibližně 1 μm odpovídá oblasti 2 kb. K takto připraveným vláknům DNA hybridizujeme fluorescenčně značené sondy (28, 29, 30). Cílová oblast, kterou pokrývají LR-PCR produkty, příp. BAC sondy, je však velmi malá vzhledem k templátové DNA na mikroskopickém skle. V takto připraveném preparátu je proto velmi obtížné hybridizované cíle najít (31).

V naší studii jsme použili přístup separace derivovaného chromozomu pomocí mikrodisekce. Tato metodika se běžně využívá k přípravě chromozomově specifických knihoven DNA, malovacích sond, a také k identifikaci marker chromozomů (32, 33). Předpokladem pro úspěšnou disekci je dostatek dobře rozptýlených chromozomů a jejich rozlišení na základě klasických barvicích technik (barvení Giemsou, G-pruhování) (32), příp. použitím fluorescenčních sond (osobní sdělení, prof. Thomas Liehr, Německo). Laserová mikrodisekce sice umožňuje rychlou a precizní disekci cílového chromozomu bez kontaminace nebo poškození genetického materiálu, nicméně pro účely izolace intersticiálních částí chromozomu nemusí být příliš vhodná (osobní sdělení, Dr. Anya Hunt, MMI, Švýcarsko). Proto jsme v naší práci zvolili konvenční mikrodisekci s použitím skleněné mikrokapiláry ovládané elektronicky řízeným mikromanipulátorem. Ve srovnání s laserovou mikrodisekcí je konvenční mikrodisekce finančně dostupnější alternativou pro rutinní využití v laboratorní praxi (34). K izolaci derivovaných chromozomů může být použita i průtoková cytometrie, ale tento přístup je závislý na velikosti chromozomů, a proto nemusí být vždy s úspěchem využit, navíc neumožňuje studium invertovaných chromozomů (20). Podobně jako při použití laserového mikrodisektoru, průtokovou cytometrií není možné separovat specifické intersticiální fragmenty derivovaných chromozomů. Pořízení průtokového cytometru umožňujícího separaci jednotlivých chromozomů je velmi nákladnou investicí, což také limituje jeho použití ve standardní laboratoři.

Disekované fragmenty chromozomů byly dále amplifikovány a sekvenovány na platformě GS Junior (Roche). Chen et al. ve studii popisují použití celogenomového sekvenátoru Illumina 1G (Solexa), který v průběhu jedné analýzy dokáže získat až miliony čtení o průměrné délce ~200 bp (20, 35). Námi použitý systém GS Junior sice poskytuje přibližně sto tisíc čtení, ale jejich medián je přibližně 400 bp, což umožňuje preciznější mapování repetitivních sekvencí, čímž stoupá využitelnost jednotlivých čtení.

Finálním krokem je poté navržení MRN testu pro kvantitativní PCR v reálném čase pro konkrétní místo zlomu derivovaného chromozomu. V případě pacienta 2 byly navrženy testy pro chromozomové zlomy na der(4) a der(11), jejich účinnost byla ověřena srovnáním s již zavedeným testem k detekci fúzního transkriptu MLL-AF4. Ověření specifity reakce pro kvantitativní PCR v reálném čase bylo provedeno pomocí směsné DNA negativních kontrol. Rozsah senzitivity testu byl stanoven desítkovým ředěním DNA z období diagnózy leukemie.

Možnou limitací popsané metody k identifikaci nových molekulárních markerů (obr. 1 B) je nedostupnost referenční sekvence (NCBI, sestava 37.3) v místě přechodu jednotlivých kontigů některých chromozomů, zejména pak v subtelomerických oblastech a v repetitivních oblastech centromer, nebo molekulárně komplikované aberace (např. inserce pod rozlišením molekulárně cytogenetických metod nebo paracentrické inverze). Další možnou limitací je stabilita nově identifikovaného molekulárního markeru v průběhu onemocnění. Z tohoto hlediska pro mikrodisekci volíme takovou chromozomovou aberaci, která je, v případě přítomnosti více klonů v karyotypu pacienta, zastoupena v každém klonu. V případě identifikace komplexních změn v karyotypu pacienta disekujeme všechny vhodné chromozomové aberace (viz der(4) a der(11) u pacienta 2), čímž je zajištěno monitorování MRN pomocí několika nezávislých cílů. U každého pacienta může být stabilita markeru (a to i již zavedeného) ovlivněna klonální evolucí. Z tohoto důvodu je vždy nutná korelace takto získaných výsledků s dalšími klinickými, biochemickými a hematologickými parametry, průtokovou cytometrií a cytogenetickou analýzou.

Kombinace metod cytogenetiky a molekulární biologie nám umožnila převést cytogenetický znak (derivovaný chromozom) leukemických buněk pacientů s AL až na molekulární (DNA sekvence) cíl určený k detekci a kvantifikaci MRN. Díky zde popsanému přístupu je možné použít nově nalezenou chromozomovou translokaci k vytvoření specifického MRN testu pro kvantitativní PCR v reálném čase, a umožnit tak senzitivní sledování úspěšnosti léčby pacientů s AL.

ZÁVĚR

Předložená práce popisuje zcela unikátní způsob identifikace molekulárního markeru pro sledování MRN u pacientů s AL. Jedná se o laboratorní přístup „šitý na míru“ nemocných s AL, který naplňuje naši představu o personalizované medicíně. V optimálním případě je MRN test v reálném čase na podkladě unikátního klonálně specifického znaku leukemické populace připraven již za 6 týdnů od stanovení diagnózy, což je zcela v souladu s potřebami rutinního diagnostického procesu u pacientů s AL, kdy první vzorky ke sledování MRN dostává laboratoř po doznění indukční terapie, což je přibližně 1 měsíc od záchytu onemocnění.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem Ministerstva průmyslu a obchodu ČR (FR-TI2/579).

Podíl autorů na přípravě rukopisu

J. T. – návrh studie a provádění experimentů, sepsání rukopisu;
 P. R. – návrh studie a provádění experimentů, bioinformatická práce, programování analyzačního software, kritická revize rukopisu;
 Š. J. – sekvenování nové generace, revize rukopisu;
 K. L. – provádění experimentů, revize rukopisu;
 H. D. W. – návrh studie a provádění experimentů, kritická revize rukopisu;
 L. T. – návrh experimentů a provádění mikrodisekcí chromozomů;
 K. N. – provádění mikrodisekcí chromozomů;
 Č. R. – návrh experimentů, experimentální práce, kritická revize rukopisu;
 Ž. L. – experimentální práce, revize rukopisu;
 K. T. – léčba pacientů s AL, sběr klinických dat, revize rukopisu;
 Ž. P. – léčba pacientů s AL, sběr klinických dat, revize rukopisu;
 K. M. – léčba pacientů s AL, sběr klinických dat, revize rukopisu;
 P. S. – návrh studie, návrh experimentů, experimentální práce, finální revize rukopisu.

Seznam zkratk a vysvětlení pojmů

AL – akutní leukemie

ALL – akutní lymfoblastová leukemie

AML – akutní myeloidní leukemie

BAC – umělý bakteriální chromozom (Bacterial Artificial Chromosome) je DNA konstrukt nesoucí rozsáhlé úseky lidské DNA. Fluorescenčně značených BAC konstruktů je ve velké míře využíváno jako hybridizačních sond v molekulární cytogenetice pro mapování chromozomálních zlomů a definovaných genomických abnormalit

DNA – deoxyribonukleová kyselina

Degenerace primeru – proces, kdy při syntéze oligonukleotidu jsou v definovaném místě zařazovány do vznikajícího řetězce kombinace bazí. Kompletní degenerace v konkrétním místě primeru například znamená přítomnost všech čtyř bazí A, T, C, G v daném místě, v takto vzniklé směsi oligonukleotidů

emPCR – emulzní PCR, při které dochází k individuálním PCR reakcím v jednotlivých tukových kapičkách, drobných nanoreaktorech. Výsledná směs je potom nanášena na pikotitrační destičku, na které probíhá vlastní proces sekvenování nové generace

Fiber-FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace na linearizovaných DNA vláknech

FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

mFISH – mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace

Kontig – sada překrývajících se DNA fragmentů, které společně reprezentují konsenzní úsek konkrétního chromozomu

LR-PCR – Long-range PCR; jedna z velmi náročných PCR aplikací, kdy jsou za specifických chemických podmínek amplifikovány dlouhé fragmenty DNA v rozsahu tisíců až desetitisíců párů bazí

mBAND – mnohobarevné fluorescenční pruhování chromozomů

MRN – minimální reziduální nemoc

Molecular combing / DNA combing – „česání“ chromozomů do podoby linearizovaných vláken DNA na silanizovaném skle

NGS – next generation sequencing; sekvenování nové generace, kdy je v průběhu jedné sekvenační reakce sekvenováno statisíce i více DNA vláken najednou. Přístroje s největší kapacitou umožňují *de novo* sekvenování celých genomů

Nick-translace – metoda (v našem případě fluorescenčního) značení DNA, při které jsou do jednoho z řetězců DNA enzymem DN-áza I zavedeny zlomy. Zlomy jsou rozeznávány enzymem DNA Polymeráza I, který v průběhu značící reakce do nově vznikajícího vlákna DNA inkorporuje standardní i fluorescenčně značené nukleotidy. Výsledkem je DNA fluorescenčně naznačená fluoroforem s definovanou vlnovou délkou, která je potom používána jako specifická sonda pro FISH

PCR – polymerázová řetězová reakce

Real-Time PCR – PCR v reálném čase

RNA – ribonukleová kyselina

LITERATURA

- Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; 18: 115-136.
- Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 112: 4-16.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116: 354-365.
- Bassan R, Spinelli O, Oldani E, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2009; 113: 4153-4162.
- Brüggenmann M, Gökbuget N, Kneba M. Acute lymphoblastic leukemia: monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. *Semin Oncol* 2012; 39: 47-57.
- Cairolì R, Beghini A, Grillo G, et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* 2006; 107: 3463-3468.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-1918.

8. Rossi G, Minervini MM, Carella AM, et al. Comparison between multi-parameter flow cytometry and WT1-RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets. *Leuk Res* 2012; 36: 401-406.
9. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 7-12.
10. Plachy R, Zejskova L, Cmejla R, et al. Five-color multiplex Real-Time PCR technology to detect over 75 recurrent chromosomal abnormalities in acute myeloid leukemia; benefits for minimal residual disease detection. *Blood* 2011; 118: 1083 (Abstract 2526).
11. Weise A, Timmermann B, Grabherr M, et al. High-throughput sequencing of microdissected chromosomal regions. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 457-462.
12. Liehr T, Weise A, Heller A, et al. Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res* 2002; 97: 43-50.
13. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941-3967.
14. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 44-54.
15. Brüggemann M, Raff T, Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood* 2012; 120: 4470-4481.
16. Schnittger S, Weisser M, Schoch C, et al. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003; 102: 2746-2755.
17. Weisser M, Kern W, Schoch C, et al. Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukemia during therapy. *Haematologica* 2005; 90: 881-889.
18. Perea G, Lasa A, Aventin A, et al. Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)]. *Leukemia* 2006; 20: 87-94.
19. Abdelhamid E, Preudhomme C, Helevaut N, et al. Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2012; 36: 316-323.
20. Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A, et al. Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing. *Genome Res* 2008; 18: 1143-1149.
21. Lu CM, Kwan J, Baumgartner A, et al. DNA probe pooling for rapid delineation of chromosomal breakpoints. *J Histochem Cytochem* 2009; 57: 587-597.
22. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Basinko A, et al. Using bacterial artificial chromosomes in leukemia research: the experience at the university cytogenetics laboratory in Brest, France. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 329471.
23. Bickmore WA. Karyotype analysis and chromosome banding. 2001; eLS. disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 112: 4-16.
24. Mundle SD, Koska RJ. Fluorescence *In Situ* Hybridization: A major milestone in luminous cytogenetics. In: Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian*. 2nd Edition, New Jersey, Humana Press, 2006; 189-201.
25. Woodcock CL, Dimitrov S. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 130-135.
26. Weissmann F, Lyko F. Cooperative interactions between epigenetic modifications and their function in the regulation of chromosome architecture. *Bioassays* 2003; 25: 792-797.
27. Baxter J, Aragón L. A model for chromosome condensation based on the interplay between condensin and topoisomerase II. *Trends Genet* 2012; 28: 110-117.
28. Weier HU. DNA fiber mapping techniques for the assembly of high-resolution physical maps. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 939-948.
29. Lebofsky R, Bensimon A. Single DNA molecule analysis: Applications of molecular combing. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2003; 4: 385-396.
30. Labit H, Goldar A, Guilbaud G, et al. A simple and optimized method of producing silanized surfaces for FISH and replication mapping on combed DNA fibers. *Biotechniques* 2008; 45: 649-652.
31. Greulich-Bode KM, Wang M, Rhein AP, Weier JF, Weier HU. Validation of DNA probes for molecular cytogenetics by mapping onto immobilized circular DNA. *Mol Cytogenet* 2008; 23: 28.
32. Engelen JJ, Albrechts JC, Hamers GJ, et al. A simple and efficient method for microdissection and microFISH. *J Med Genet* 1998; 35: 265-268.
33. Shim SH, Kyhm JH, Chung SR, et al. Generation of FISH probes using laser microbeam microdissection and application to clinical molecular cytogenetics. *J Microbiol Biotechnol* 2007; 17: 1079-1082.
34. Grossmann V, Höckner M, Karmous-Benailly H, et al. Parental origin of apparently balanced de novo complex chromosomal rearrangements investigated by microdissection, whole genome amplification, and microsatellite-mediated haplotype analysis. *Clin Genet* 2010; 78: 548-553.
35. Chen W, Ullmann R, Langnick C, et al. Breakpoint analysis of balanced chromosome rearrangements by next-generation paired-end sequencing. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 539-543.

Doručeno do redakce: 17. 9. 2012

Přijato po recenzi: 11. 1. 2013

Mgr. Tereza Jančušková

Laboratoř molekulární diagnostiky

Laboratoře CHAMBON s.r.o.

Evropská 176/16

160 00 Praha 6